

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der  
Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Untersuchung zum Vorkommen des porcinen Circovirus  
Typ 3 in Serum- und Spermaproben von Zuchtebern einer  
deutschen Besamungsstation

von Michael Matthias Martin Müller

aus Augsburg

München 2021



Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Krankheiten des Schweines

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof Dr. Mathias Ritzmann

Betreuung durch: PD Dr. habil. Matthias Eddicks



Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Sonja Härtle

Tag der Promotion: 17. Juli 2021



Meiner Familie





## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Circoviren .....</b>	<b>3</b>
1.1.	Porzine Circoviren .....	3
1.2.	Porzines Circovirus Typ 3 .....	4
1.2.1.	Genetische Vielfalt von PCV3 .....	6
1.2.2.	Evolution von PCV3 .....	7
<b>2.</b>	<b>Mögliche durch PCV3 verursachte Krankheitsbilder .....</b>	<b>7</b>
<b>3.</b>	<b>Übertragungswege und Pathogenese von PCV3.....</b>	<b>9</b>
3.1.	Infektionsversuche und Erregerreservoir .....	9
3.2.	Koinfektionen mit anderen Pathogenen .....	11
3.3.	Übertragung von PCV3.....	12
3.3.1.	Horizontale Übertragung .....	12
3.3.2.	Vertikale Übertragung .....	12
<b>4.</b>	<b>Epidemiologische Relevanz von Besamungsstationen .....</b>	<b>13</b>
4.1.	Rolle von Zuchtebern für die Verbreitung von Pathogenen .....	13
4.2.	Porzine Circoviren bei Zuchtebern .....	15
<b>5.</b>	<b>Nachweis von PCV3 .....</b>	<b>17</b>
5.1.	Nachweis von PCV3-DNA mittels PCR .....	18
5.2.	Genomnachweis von PCV3 mittels isothermaler Amplifikation.....	19
5.3.	Indirekter Erregernachweis .....	20
5.4.	Virusisolation von PCV3 .....	20
5.5.	Befunde histopathologischer Untersuchungen .....	21
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>23</b>
<b>1.</b>	<b>Ziel der Arbeit .....</b>	<b>23</b>
<b>2.</b>	<b>Probenentnahme und Lagerung.....</b>	<b>23</b>
<b>3.</b>	<b>Bestands- und Tierinformationen.....</b>	<b>24</b>
<b>4.</b>	<b>Labordiagnostische Untersuchungen .....</b>	<b>27</b>
4.1.	DNA-Extraktion.....	27

4.1.1.	DNA-Extraktion aus Serumproben (Serumpools) .....	27
4.1.2.	DNA-Extraktion aus Spermaproben und Serumeinzelproben .....	27
4.2.	Quantitative PCR.....	27
<b>5.</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>28</b>
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>30</b>
<b>1.</b>	<b>Molekularbiologische Untersuchungsergebnisse der Serumproben .....</b>	<b>30</b>
1.1.	Ergebnisse der Serumpools.....	30
1.2.	Ergebnisse der Einzel-PCR .....	30
1.2.1.	Qualitative Auswertungen der Serumproben .....	31
1.2.2.	Quantitative Auswertungen der Serumproben .....	33
1.3.	Ergebnisse in Abhängigkeit von der Genetik.....	36
<b>2.</b>	<b>Molekularbiologische Untersuchungsergebnisse der Spermaproben .....</b>	<b>37</b>
2.1.	Ergebnisse der Spermapoolproben .....	37
2.2.	Ergebnisse der Einzel-PCR .....	39
2.3.	Assoziation der Ergebnisse der Spermauntersuchung mit dem Alter, der Genetik und der korrespondierenden Serumprobe .....	39
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse in Abhängigkeit der Herkunftsbetriebe .....</b>	<b>39</b>
3.1.	Molekularbiologische Untersuchungsergebnisse der Serumproben in Abhängigkeit der Herkunftsbetriebe .....	39
3.2.	Molekularbiologische Untersuchungsergebnisse der Spermaproben auf Ebene der Herkunftsbetriebe .....	41
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>43</b>
<b>1.</b>	<b>Nachweis von PCV3-DNA im Serum.....</b>	<b>43</b>
1.1.	Auswertung auf Ebene der Herkunftsbetriebe .....	43
1.2.	Qualitative Auswertung auf Einzeltierebene.....	44
1.3.	Quantitative Auswertung der Serumproben .....	49
1.4.	Eignung des gewählten Probenmaterials .....	51
<b>2.</b>	<b>Nachweis von PCV2/3-DNA im Sperma.....</b>	<b>52</b>
2.1.	Qualitative Auswertung der Spermaproben.....	52
2.2.	Bezug zu den Ergebnissen der Serumproben .....	53

---

3.	Bewertung der Relevanz von Ebersperma für die Verbreitung von PCV3.....	55
VI.	ZUSAMMENFASSUNG .....	59
VII.	SUMMARY .....	61
VIII.	TABELLENVERZEICHNIS .....	63
IX.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	64
X.	LITERATURVERZEICHNIS .....	65
XI.	DANKSAGUNG.....	81

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
A	Adenin
<i>B. suis</i>	<i>Brucella suis</i>
bp	base pairs
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CD/CD	caesarian derived colostum
	deprived
CI	Konfidenzintervall
CSFV	classical swine fever virus
<i>C. suis</i>	<i>Chlamydia suis</i>
ct	cycle threshold
DE	<i>Deutsches Edelschwein</i>
DL	<i>Deutsche Landrasse</i>
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtri- phosphate
Du	<i>Duroc</i>
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
G	Guanin
Ib	<i>Cerdo Iberico</i>
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IR	intergenic region
ISH	in-situ-Hybridisierung
KB	Künstliche Besamung
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
Max	Maximum
Min	Minimum
ml	Milliliter
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
nm	Nanometer
OR	Odds Ratio
ORF	open reading frame
PCR	polymerase chain reaction

PCV	porzines Circovirus
PCVD	porcine circovirus diseases
PDNS	porcine dermatitis and nephrophathy syndrome
PEDV	porcine epidemic diarrhea virus
Pi	<i>Piétrain</i>
p.i.	post infectionem
PMWS	post weaning multisystemic wasting syndrome
PPV	porcine Parvoviren
PRRS	porcine reproductive and respiratory syndrome
PRRSV	porcine reproductive and respiratory syndrome virus
RCA	rolling-circle amplification
RCR	rolling-circle-replication
RNA	ribonucleic acid
RPA	recombinase polymerase amplification
SD	Standardabweichung
SPF	spezifisch pathogenfrei
ssp.	Subspezies
T	Thymin

## I. EINLEITUNG

Im Jahr 2016 wiesen PHAN et al. (2016) und PALINSKI et al. (2017) in Schweinen mit dem klinischen Bild multisystemischer Entzündungen bzw. des porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) ein neuartiges Virus mit zirkulärer DNA nach. Weitere Analysen ergaben, dass es sich um ein Circovirus handelt, bei dem die DNA-Sequenz im Vergleich zum porcinen Circovirus Typ 1 (PCV1) und dem porcinen Circovirus Typ 2 (PCV2) wesentlich länger ist (PHAN et al., 2016). Die auf den nordamerikanischen Schweinebeständen in den erkrankten Tieren nachgewiesenen viralen DNA-Sequenzen konnten einem einheitlichen Cluster zugeordnet werden (PALINSKI et al., 2017). Das neu beschriebene Virus wurde fortan als porcines Circovirus Typ 3 (PCV3) tituliert (PHAN et al., 2016; PALINSKI et al., 2017). In der darauffolgenden Zeit, konnte PCV3 auch in Beständen in Südamerika (TOCHETTO et al., 2018; RODRIGUES et al., 2020), Europa (FACCINI et al., 2017; STADEJEK et al., 2017; FUX et al., 2018) und Asien nachgewiesen werden (KU et al., 2017; BERA et al., 2020; CHANG et al., 2021). Inzwischen wird PCV3 mit verschiedensten klinischen Bildern in Verbindung gebracht. Unter anderem wird regelmäßig über den Nachweis von PCV3 in Abortmaterial bzw. totgeborenen oder mumifizierten Feten aus Fällen von Fruchtbarkeitsstörungen berichtet (PALINSKI et al., 2017; ZOU et al., 2018; SERENA et al., 2020; SAPORITI et al., 2021). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass diaplazentare Infektionen möglicherweise eine relevante Rolle bei der Verbreitung von PCV3 in der Hausschweinpopulation spielen (KU et al., 2017).

In diesem Zusammenhang wird in der vorliegenden Untersuchung die Relevanz von Ebersperma aus einer deutschen Eberstation, die circa 740 Ferkelerzeugerbestände regelmäßig mit Samen beliefert, bewertet. Eine Besamungsstation wurde ausgewählt, da Bestände mit einer großen Anzahl an Kontaktbeständen innerhalb einer kurzen Zeitspanne, für die Verbreitung von Pathogenen von besonderer Relevanz sein können (BUTTNER et al., 2015). Die epidemiologische Relevanz dieser Bestände wurde bereits im Zusammenhang mit anderen Krankheitserregern belegt

(ELBER et al., 1999; NATHUES et al., 2016).

Im Rahmen dieser Studie wurden Blut- und Nativspermaproben von Zuchtebern einer Besamungsstation auf PCV3-DNA untersucht, mit dem Ziel die Verbreitung von PCV3 bei Zuchtebern zu erfassen. Außerdem soll die Relevanz der künstlichen Besamung (KB) für die Verbreitung von PCV3, bewertet werden. Folgende Arbeitshypothesen werden überprüft.

1. PCV3-DNA kann aufgrund des ubiquitären Charakters der porcinen Circoviren auch in Serum- und Nativspermaproben von Zuchtebern nachgewiesen werden.
2. Die Nachweishäufigkeit von PCV3 Genom im Sperma korreliert mit dem Alter der untersuchten Tiere.

Auch wenn der Schwerpunkt dieser Studie auf PCV3 liegt, wird durch die Verwendung einer multiplex PCR gleichzeitig der PCV2-Status erfasst.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Circoviren**

Die Circoviren sowie die Cycloviren gehören der Virusfamilie Circoviridae an (ROSARIO et al., 2017). Das Genus Gyrovirus, das lediglich aus dem chicken anemia virus besteht, wurde lange Zeit den Circoviridae zugeordnet, gehört nun aber zu den Anelloviridae (ROSARIO et al., 2017). Für Circoviren waren lange Zeit nur porcine und aviäre Spezies wie das beak and feather disease virus bekannt (TISCHER et al., 1982; TODD, 2000). Im letzten Jahrzehnt konnten dann in weiteren Säugetierspezies, wie Hunden (LI et al., 2013) und Nerzen (LIAN et al., 2014), Circoviren entdeckt werden.

#### **1.1. Porzine Circoviren**

Im Jahre 1974 entdeckten TISCHER et al. (1974) ein neuartiges Virus als Kontaminante der Nierenzelllinie PK-15 und beschrieben eine Ähnlichkeit zu Papova- und Picornaviren. Das neu entdeckte Virus konnte 1982 besser charakterisiert werden. Da lediglich in Schweinen Antikörper gefunden wurden und das Virus zudem eine zirkuläre DNA besaß, wurde es als porcines Circovirus bezeichnet (TISCHER et al., 1982). Zwar wurde die weite Verbreitung dieses Virus nachgewiesen, jedoch konnte kein klinisches Bild mit diesem Erreger in Verbindung gebracht werden (TISCHER et al., 1986). In den 1990er Jahren traten die ersten Fälle des porcine multisystemic wasting syndrome (PMWS) auf, aus denen Viruspartikel ähnlich PCV isoliert werden konnten (ELLIS et al., 1998).

Nachdem die Virusisolierung aus Gewebe von Schweinen mit klinischen Zeichen von PMWS gelang, wurde festgestellt, dass sich das Genom von dem aus den Nierenzelllinien isolierten PCV unterscheidet (MEEHAN et al., 1998). Daraufhin wurde vorgeschlagen, das aus den PK-15 Zellen isolierte Virus als PCV1 und jenes aus den PMWS-Fällen als porcines Circovirus Typ 2 (PCV2) zu bezeichnen (MEEHAN et al., 1998). Zusätzlich zu PMWS wird PCV2 mit weiteren Krankheitsbildern, den sogenannten porcine circovirus diseases (PCVD) in Verbindung gebracht (SEGALES et



al., 2005). Diese werden von SEGALLES (2012) wie folgt benannt: PCV2 subclinical infection, PCV2 enteric disease, PCV2 lung disease, PCV2 reproductive disease, porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) und PMWS wird als PCV2 systemic disease deklariert.

Im Jahr 2016 beschrieben PHAN et al. (2016) als erste Forschungsgruppe PCV3, auf das in den folgenden Kapiteln genauer eingegangen wird. Im April 2019 identifizierte eine chinesische Forschungsgruppe ein neuartiges Circovirus in Schweinen mit respiratorischen Problemen und Durchfallproblematik und gaben ihm die vorläufige Bezeichnung porzines Circovirus Typ 4 (PCV4) (ZHANG et al., 2020). Die höchste Übereinstimmung der DNA-Sequenz besteht mit dem mink Circovirus, während zu den anderen porzinen Circoviren lediglich eine Übereinstimmung von 43,2 % – 51,5 % besteht (ZHANG et al., 2020). In Europa steht der Nachweis von PCV4 noch aus (FRANZO et al., 2020b).

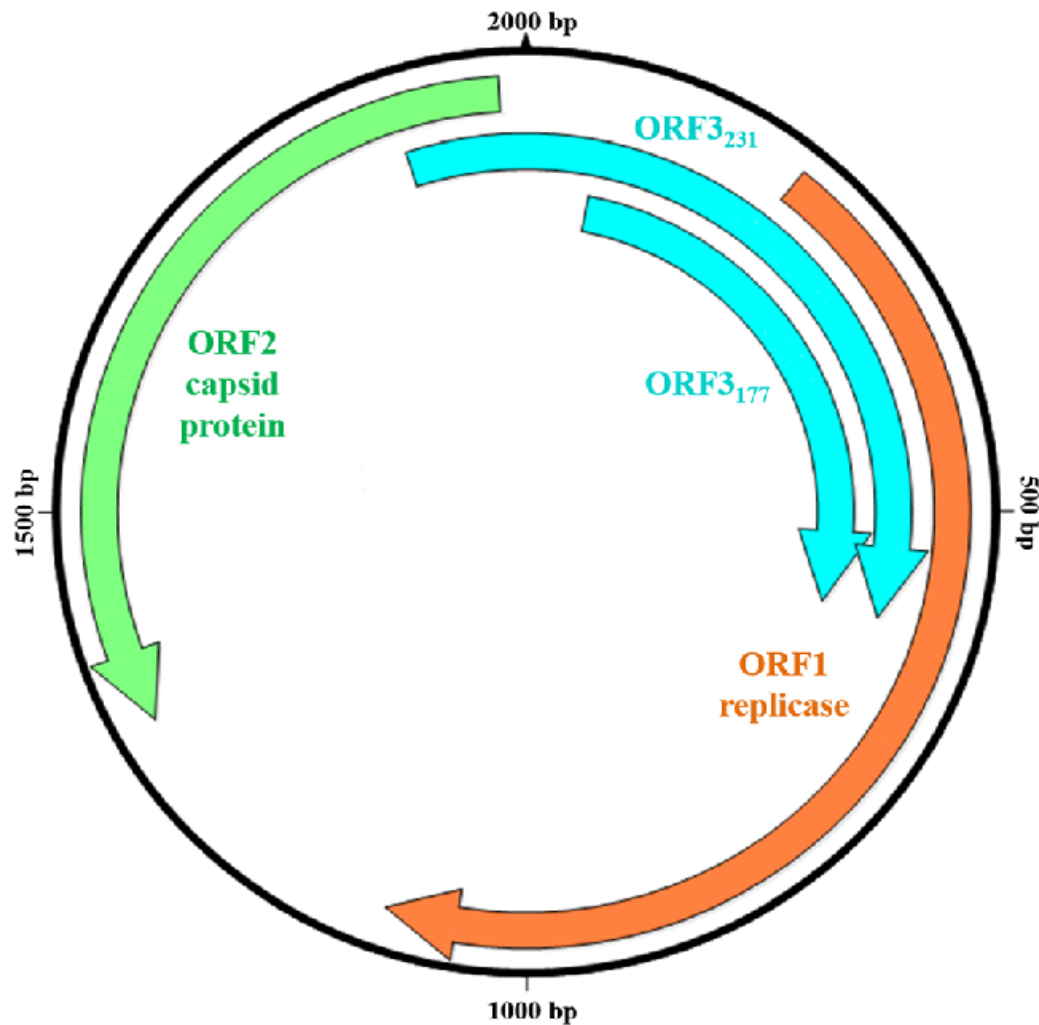
Bei den porzinen Circoviren handelt es sich um DNA-Viren, welche ein ringförmiges, einzelsträngiges und kovalent geschlossenes Genom aufweisen (TISCHER et al., 1982). Das Genom wird von einem Kapsid umschlossen, welches ikosaedral geformt und unbehüllt ist (CROWTHER et al., 2003).

## **1.2. Porzines Circovirus Typ 3**

Das Genom von PCV3 umfasst 2000 Basenpaare (bp) (PHAN et al., 2016) und ist somit größer als das Genom von PCV1 (1759 bp) (TISCHER et al., 1982) bzw. PCV2 (1766-1768 bp (PCV2a-d); 1777 bp (PCV2e)) (MEEHAN et al., 1997; HAMEL et al., 1998; FRANZO et al., 2015; DAVIES et al., 2016). Bei Betrachtung der DNA-Sequenzen auf Ebene der Aminosäuren, stimmen die Aminosäuresequenzen von PCV1 und PCV2 nur zu 31 % bzw. 48 % mit jenen von PCV3 überein (PALINSKI et al., 2017). Für die porzinen Circoviren sind bestimmte Gensequenzen, sogenannte open reading frames (ORF) beschrieben, welche für bestimmte funktionelle Proteine, wie das Rep- und Cap-Protein, kodieren (MANKERTZ et al., 1997). Das Genom von PCV3 weist eine stem-loop Struktur auf (TAGTATTAC), welche neun Nukleotide lang ist und als Replikationsursprung (*ori*) für den Beginn der für Circoviren typischen

rolling-circle-replication (RCR) dient (PALINSKI et al., 2017). Diese stem-loop-Struktur befindet sich in der 235 Nukleotide langen intergenischen Region (IR), welche zwischen ORF1 und ORF2 zu finden ist (PHAN et al., 2016).

Der ORF1 kodiert für ein wahrscheinlich 296 Aminosäuren langes Rep-Protein, welches zu 48 % identisch mit dem Rep-Protein von PCV2 ist (PHAN et al., 2016). Der ORF1, mit dem Startcodon GTC, liegt zwischen den Nukleotiden 223 und 1133 (FACCINI et al., 2017; PALINSKI et al., 2017). Das 214 Aminosäuren lange Cap-Protein, wird vom ORF2 kodiert, und weist bei Betrachtung der Primärstruktur lediglich eine Übereinstimmung von 24 % und 26 % zu den Primärstrukturen der jeweiligen Cap-Proteine von PCV1 und PCV2 auf (PALINSKI et al., 2017). Der ORF2 befindet sich zwischen den Nukleotidpositionen 1343 und 1987 und orientiert sich in entgegengesetzter Richtung zum ORF1 (PALINSKI et al., 2017). Zusätzlich zu den bereits beschriebenen ORFs wird ein ORF3 zwischen den Nukleotidpositionen 1907 bis 602 beschrieben und würde somit für ein 231 Aminosäuren langes Protein kodieren (PALINSKI et al., 2017). In den nordamerikanischen Studien wird das Startcodon mit TCG beschrieben (PALINSKI et al., 2017), jedoch wurde in einer italienischen Studie an dieser Stelle das Codon mit TTT beschrieben, welches für Phenylalanin kodiert und ein ungewöhnliches Startcodon wäre (FACCINI et al., 2017). Als alternatives Startcodon wird an Aminosäurenposition 55 Methionin vorgeschlagen, woraus ein 177 Aminosäuren langes Protein resultieren würde (FACCINI et al., 2017). Für PCV3 ist die Funktion des vom ORF3 kodierten Proteins bis dato noch nicht bekannt (PALINSKI et al., 2017), wohingegen für das bei PCV2 kodierte Protein ein apoptotischer Effekt beschrieben wird (KARUPPANNAN et al., 2009).



**Abbildung 1:** Darstellung des zirkulären PCV3 Genoms aus FUX et al. (2018), mit den open reading frames 1, 2, 3 und dem alternativen ORF3, welcher erstmals von FACCINI et al. (2017) vorgeschlagen wurde.

### 1.2.1. Genetische Vielfalt von PCV3

PCV3 ist weltweit verbreitet in Schweinebeständen zu finden (FACCINI et al., 2017; FRANZO et al., 2018c; KEDKOVID et al., 2018a; TOCHETTO et al., 2018; OUYANG et al., 2019; BERA et al., 2020). Die bisher verfügbaren phylogenetischen Informationen lassen auf eine niedrige genetische Variabilität im Vergleich zu anderen Einzelstrang-DNA Viren und eine hohe Stabilität des Genoms schließen (KLAUMANN et al., 2018). Beim Vergleich der verfügbaren Sequenzen lässt sich eine hohe Sequenzidentität auf Nukleotid- und auf Aminosäurenebene feststellen (FUX et al., 2018; HAYASHI et al., 2018; QI et al., 2019). FUX et al. (2018) schlagen eine Unterteilung in zwei PCV3 Cluster (PCV3a, PCV3b) mit jeweils zwei Subclustern vor und können keinen geographischen Bezug für die unterschiedlichen Virusstämme feststellen. Andere

Forschungsgruppen unterteilen PCV3 in drei Stämme (PCV3a, 3b, 3c) anhand von zwei Aminosäuremutationen im Cap-Protein (QI et al., 2019). Eine kolumbianische Forschungsgruppe unterteilt den Stamm PCV3a in die Untergruppen PCV3a1 und PCV3a2 basierend auf den Vollgenomsequenzen (VARGAS-BERMUDEZ et al., 2019). FRANZO et al. (2020a) legen sich lediglich auf den Genotypen PCV3a fest. Aufgrund der Tatsache, dass immer mehr neue Vollgenomsequenzen von PCV3 gefunden werden, wird die Einteilung in Zukunft möglicherweise geändert und angepasst werden müssen (KLAUMANN et al., 2018).

### **1.2.2. Evolution von PCV3**

In retrospektiven Studien konnte nachgewiesen werden, dass PCV3 schon Jahre vor seiner Erstbeschreibung in der Hausschweinpopulation zirkulierte. So konnte PCV3 zum Beispiel in Brasilien in Proben von 2006 (SARAIVA et al., 2019) und in Europa bis in das Jahr 1993 in Schweden (YE et al., 2018) und 2001 im Vereinigten Königreich retrospektiv nachgewiesen werden (COLLINS et al., 2017). FU et al. (2018) vermuten anhand eines statistischen Modells, dass PCV3 bereits seit 1966 in den Schweinpopulationen zirkuliert. Schon bei der Erstbeschreibung von PCV3 wurde ein bei Fledermäusen beschriebenes Circovirus als das am nächsten verwandte Virus beschrieben (PHAN et al., 2016). Eine russische Forschungsgruppe stellte die Theorie auf, dass es sich bei PCV3 um ein altes Virus handelt, welches seine Entwicklung in Fledermäusen begann und sich mit der Zeit an Schweine als Hauptwirt angepasst hat (YUZHAKOV et al., 2018).

## **2. Mögliche durch PCV3 verursachte Krankheitsbilder**

Die ersten Nachweise von PCV3 erfolgten in erkrankten Tieren, bei denen eine Infektion mit PCV2 als Krankheitsursache vermutet, jedoch nicht nachgewiesen wurde (PHAN et al., 2016; PALINSKI et al., 2017).

Im Jahr 2016 wurde erstmals PCV3-DNA in drei klinisch auffälligen Aufzuchtferkeln, welche an multisystemischen Entzündungen mit kardialer Beteiligung litten, nachgewiesen (PHAN et al., 2016). Histologisch konnte in mit PCV3 inokulierten CD/CD Schweinen, welche

im Verlauf des Infektionsversuchs klinisch gesund blieben, Zeichen einer generalisierten multisystemischen Entzündung nachgewiesen werden (MORA-DIAZ et al., 2020; TEMEEYASEN et al., 2021).

Eine andere Forschungsgruppe berichtet von einem Schweinebestand mit einer erhöhten Mortalität bei den Sauen, welche das klinische Bild des PDNS zeigten (PALINSKI et al., 2017). Zwar deckten sich die makroskopischen und histologischen Läsionen mit denen des PDNS-Syndroms, jedoch konnten weder PCV2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) noch das Influenza A Virus nachgewiesen werden (PALINSKI et al., 2017). Durch metagenomische Analysen konnte schließlich ein bis dato unbekanntes Virusgenom nachgewiesen werden (PALINSKI et al., 2017). Dieses Virus wurde nachfolgend als PCV3 betitelt (PALINSKI et al., 2017). Darüber hinaus untersuchten PALINSKI et al. (2017) Material von 48 PDNS-Fällen, welche in vorherigen Untersuchungen nachweislich PCV2 negativ waren. In 45 (93,8 %) dieser untersuchten Fälle wurde PCV3 Genom nachgewiesen (PALINSKI et al., 2017). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein möglicher Zusammenhang von PCV3 mit PDNS ähnlichen Erkrankungen hergestellt (PALINSKI et al., 2017). In selbigem Bestand wurden auch Reproduktionsstörungen beobachtet (PALINSKI et al., 2017), auf die weiter unten eingegangen wird.

ZHAI et al. (2017) assoziieren PCV3 Infektionen mit dem Auftreten respiratorischer Erkrankungen. Darüber hinaus werden PCV3 Infektionen mit Durchfallerkrankungen (ZHAI et al., 2017; QI et al., 2019) und neurologischen Störungen in Verbindung (CHEN et al., 2017) gebracht.

PALINSKI et al. (2017) wiesen als erste Arbeitsgruppe PCV3 in abortierten Feten nach. Die Feten stammten aus einem Sauenbestand mit Reproduktionsstörungen, welche sich in Form von verminderten Konzeptionsraten und vermehrten Aborten manifestierten (PALINSKI et al., 2017). Darüber hinaus litten die Muttertiere an einem PDNS ähnlichem klinischen Bild (PALINSKI et al., 2017). Gleichzeitig konnte die Anwesenheit von anderen relevanten Pathogenen wie PCV2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) und dem Influenza A Virus in den Probenmaterialien ausgeschlossen werden (PALINSKI et

al., 2017). In einer Vielzahl an weiteren Studien konnte ebenfalls PCV3 Genom in abortierten Feten nachgewiesen und ein möglicher Zusammenhang zwischen PCV3 Infektionen und Reproduktionsstörungen hergestellt werden (TOCHETTO et al., 2018; ZOU et al., 2018; DEIM et al., 2019; SERENA et al., 2020; SAPORITI et al., 2021). Jedoch werden in manchen Studien auch Koinfektionen mit anderen potenziell ursächlichen Erregern wie porcinen Parvoviren (PPV), PCV2, PRRSV oder *Leptospira* ssp. nachgewiesen (TOCHETTO et al., 2018; DAL SANTO et al., 2020; SERENA et al., 2020). Die Studie von SAPORITI et al. (2021) ist der aktuellste Bericht über mit PCV3 assoziierte Reproduktionsstörungen. In 16 von 53 untersuchten Aborten, konnte PCV3 Genom in Abwesenheit anderer Erreger nachgewiesen werden (SAPORITI et al., 2021). In vier von sechs Fällen mit hohen Viruslasten (ct <30) konnte mittels in situ Hybridisierung PCV3 Genom in milden histologischen Läsionen (Arteritis und Periarteritis in mehreren Geweben) detektiert werden (SAPORITI et al., 2021). MORA-DIAZ et al. (2020) gelang darüber hinaus die Virusisolation eines PCV3-Isolats aus Fällen von Reproduktionsstörungen. Das PCV3-Isolat ISU27734, welches aus oben beschriebenen Fällen stammt, replizierte auch in vivo in inokulierten CD/CD (caesarian derived / colostrum deprived) Schweinen, wobei es kein klinisches Bild verursachte (MORA-DIAZ et al., 2020). Berichte über Infektionsversuche in denen Reproduktionsstörungen durch PCV3 verursacht wurden, sind momentan noch nicht vorhanden.

Entgegen den oben erwähnten Berichten, gibt es mehrere Studien, welche PCV3 Infektionen in Tieren aus Beständen ohne jegliche Klinik nachgewiesen haben (STADEJEK et al., 2017; ZHENG et al., 2017; WEN et al., 2018).

### **3. Übertragungswege und Pathogenese von PCV3**

#### **3.1. Infektionsversuche und Erregerreservoir**

Bis jetzt gibt es wenige Studien in denen Infektionsversuche durchgeführt wurden, die den Verlauf einer PCV3 Infektion auf immunologischer und pathologischer Ebene untersuchten. Ein aktueller Infektionsversuch wurde von MORA-DIAZ et al. (2020) mit CD/CD Schweinen durchgeführt. Das

Isolat ISU27734 wurde aus Fällen von Reproduktionsstörungen auf PK-15 Nierenzelllinien isoliert (MORA-DIAZ et al., 2020). Zwar entwickelten die mit dem Isolat ISU27734 inokulierten Schweine kein klinisches Bild einer Erkrankung, jedoch konnten in der histopathologischen Untersuchung an multiplen Organen entzündliche Läsionen dargestellt werden (MORA-DIAZ et al., 2020). Alle acht mit dem PCV3-Isolat inokulierten CD/CD Schweine entwickelten eine Virämie, was ein klarer Hinweis auf Replikation des Erregers im Wirt ist (MORA-DIAZ et al., 2020). Mit einem für diesen Versuch entwickelten indirektem ELISA, konnte bei vier Tieren ein starker Anstieg von IgM-Antikörpern in der ersten und in der vierten Woche p.i. (post infectionem) beobachtet werden (MORA-DIAZ et al., 2020). Die Bildung von IgG-Antikörpern wurde nicht beobachtet, was die Autoren mit der kurzen Studiendauer von 28 Tagen begründen (MORA-DIAZ et al., 2020). Entsprechend den Beobachtungen der vorherigen Studie, konnten TEMEEYASEN et al. (2021) ebenfalls keine Klinik und keine verstärkte T-Zell-Reaktion nachweisen.

Wildschweinen (*Sus scrofa scrofa*) wird eine potenzielle Rolle als Virusreservoir zugeschrieben (FRANZO et al., 2018a). PCV3 scheint bei dieser Spezies apathogen zu sein und wurde in zwei Studien mit hoher Prävalenz nachgewiesen (FRANZO et al., 2018a; KLAUMANN et al., 2019b). In einer in Norditalien durchgeführten Studie wurden 187 Serumproben von Wildschweinen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass 30 % der untersuchten Tiere bei erhaltener Gesundheit eine PCV3-Virämie durchmachten (FRANZO et al., 2018a). Dabei unterschied sich die Nachweisrate zwischen männlichen und weiblichen Tieren nicht (FRANZO et al., 2019). In Spanien wurden retrospektiv Proben von Wildschweinen aus dem Zeitraum von 2004 – 2018 untersucht, wobei eine PCV3-Nachweisrate von 42,66 % (221/518) ermittelt wurde (KLAUMANN et al., 2019b). Im Rahmen derselben Studie konnte bei mehrfach beprobten Tieren, teilweise über fünf Monate hinweg, längerfristig PCV3 nachgewiesen werden, weswegen eine mögliche persistente Infektion von Wildschweinen in Betracht gezogen wird (KLAUMANN et al., 2019b). Auch aus Deutschland und Sardinien gibt es Studien, die über die weite Verbreitung von PCV3 Infektionen bei Wildschweinen berichten (PRINZ et

al., 2019; DEI GIUDICI et al., 2020).

Zusätzlich konnte PCV3 in Wildwiederkäuern und Zecken der Gattung *Ixodes Ricinus* nachgewiesen werden (FRANZO et al., 2019). Darüber hinaus erfolgte der frequente Nachweis (28,95 %) in klinisch gesunden Hausrindern, deren Proben aus dem Zeitraum von 2011 bis 2018 stammten (LI et al., 2020). Aufgrund des Nachweises in noch weiteren Tierarten, vermuten OUYANG et al. (2019) eine Kreuzübertragung zwischen Tierarten und schließen ein zoonotisches Potenzial für den Menschen nicht aus.

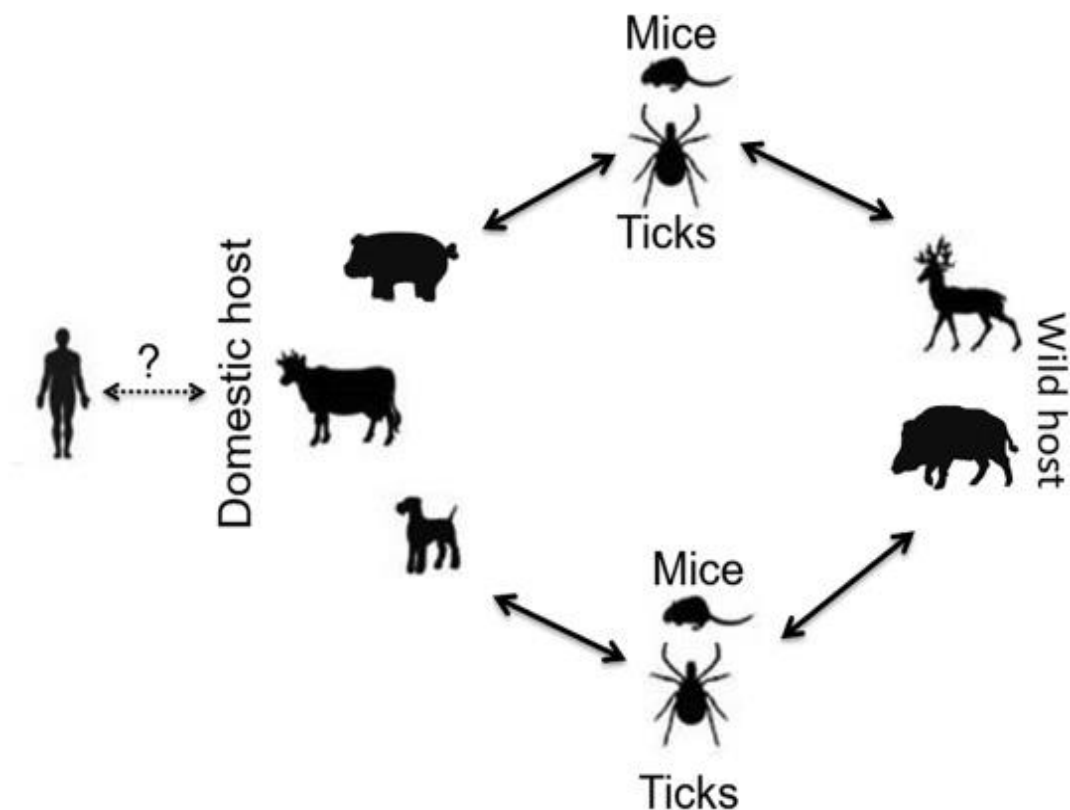


Abbildung 2: Darstellung der vermuteten Erregerzirkulation von PCV3 in Wildtierpopulationen nach OUYANG et al. (2019).

### 3.2. Koinfektionen mit anderen Pathogenen

Während beim Erstnachweis von PCV3 andere relevante Pathogene ausgeschlossen wurden (PHAN et al., 2016), konnten bei weiteren Untersuchungen gleichzeitig andere Pathogene nachgewiesen werden (KLAUMANN et al., 2018).

PRINZ et al. (2019) wiesen in deutschen Wildschweinen sowohl Koinfektionen mit PCV1, als auch PCV2 und sogar Dreifachinfektionen



nach (PCV1/PCV2/PCV3). Außerdem wurde ein gemeinsames Auftreten mit PRRSV und verschiedenen porcinen Parvoviren (PPV2, PPV6, PPV7) beschrieben (HA et al., 2018). Darüber hinaus wurde das gehäufte gemeinsame Auftreten mit dem Torque teno sus Virus 1 bzw. 2 nachgewiesen (ZHENG et al., 2018a).

In einer retrospektiven Studie in China gab es hohe Nachweisraten von Koinfektionen im Zusammenhang mit dem classical swine fever virus (CSFV) (SUN et al., 2018). Darüber hinaus wurde PCV3 zusammen mit dem porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) nachgewiesen (HAN et al., 2019).

### **3.3. Übertragung von PCV3**

Bezüglich der Erregerübertragung von PCV3 werden sowohl die horizontale als auch die vertikale Übertragung als relevant erachtet (OUYANG et al., 2019). Verglichen zu den umfangreichen Studien bezüglich PCV2 (ROSE et al., 2012), sind die Übertragungswege von PCV3 wenig erforscht.

#### **3.3.1. Horizontale Übertragung**

Für die horizontale Übertragung sprechen der Nachweis von PCV3-DNA in Speichel, Nasenausfluss, Fäzes und Serum (STADEJEK et al., 2017; PLUT et al., 2020; WOZNIAK et al., 2020).

Für das verwandte PCV2 sehen PATTERSON und OPRIESSNIG (2010) eine höhere Gefahr im direkten Kontakt infizierter Tiere mit immunologisch naiven Tieren. Im Gegensatz dazu wird der indirekten Übertragung durch Impfung und Aerosole ein geringerer Stellenwert zugeordnet (PATTERSON & OPRIESSNIG, 2010).

#### **3.3.2. Vertikale Übertragung**

Die vertikale Übertragung wird als zusätzlicher potenzieller Verbreitungsweg von PCV3 gesehen (OUYANG et al., 2019). Ein Indiz dafür sind sowohl der Nachweis von PCV3-DNA in Sauenkolostrum (KEDKOVID et al., 2018b) als auch die hohe Zahl an Studien, welche PCV3-DNA in Aborten und mumifizierten Feten nachgewiesen haben (PALINSKI et al., 2017; ZOU et al., 2018; BERA et al., 2020; SAPORITI et al., 2021). Diese Beobachtungen lassen für PCV3 eine Relevanz der vertikalen

Übertragung vermuten. Zur vertikalen Übertragung von PCV2 gibt es verglichen zu PCV3 zusätzliche Kenntnisse, auf die in der Folge eingegangen wird.

So konnte in Nordamerika in einer großen Zahl an neugeborenen Saugferkeln eine PCV2-Virämie nachgewiesen werden (SHEN et al., 2010), eine Beobachtung, die EDDICKS et al. (2016) für bayerische Ferkelerzeuger nicht bestätigen konnten. Jedoch ergaben Querschnittsuntersuchungen in einem Betrieb zur Jungsauenvermehrung eine verbreitete Erregerzirkulation in subklinisch infizierten Tieren (EDDICKS et al., 2019). Darüber hinaus erfolgte der vermehrte Nachweis von PCV2 Genom in Serumproben von Tieren in der ersten Trächtigkeitshälfte (EDDICKS et al., 2019). In erdrückten Saugferkeln konnte häufig und in hohen Mengen PCV2 Genom nachgewiesen werden (MAURER, 2020.). Darüber hinaus konnten SYDLER et al. (2016) in sämtlichen untersuchten Schweinefeten aus den letzten beiden Trächtigkeitsdritteln mit PCV2 infizierte Zellen im Thymus, unter Verwendung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung nachweisen. Außerdem wird vermutet, dass Saugferkel in eine mit PCV2 belastete Umgebung geboren werden und sich, falls keine diaplazentare Infektion erfolgt ist, dort infizieren (DVORAK et al., 2013). Diese für PCV2 vorhandenen Erkenntnisse, fehlen Stand jetzt für PCV3.

Analog zum Nachweis von PCV3-DNA in Ebersperma (KU et al., 2017), konnte sowohl die Präsenz von PCV2 in Ebersperma (HAMEL et al., 2000) als auch die Infektiosität desselbigen nachgewiesen werden (MADSON et al., 2009a). Aufgrund des Nachweises von PCV3-DNA im Sperma, sollte eine mögliche Relevanz der Zuchteberstationen für die Erregerverbreitung in Schweinepopulationen untersucht werden. Daher wird im Anschluss der jetzige Kenntnisstand bezüglich der epidemiologischen Relevanz von Zuchteberstationen für die Schweinehaltung dargelegt.

## **4. Epidemiologische Relevanz von Besamungsstationen**

### **4.1. Rolle von Zuchtebern für die Verbreitung von Pathogenen**

Betriebe mit einem hohen sogenannten Output-Value gehören zu den

relevantesten epidemiologischen Einheiten für die Weiterverbreitung von Pathogenen in der Hausschweinpopulation (BUTTNER et al., 2015). Daher bedarf es einer verstärkten epidemiologischen Überwachung solcher zentralen Kontaktstrukturen (BUTTNER et al., 2016). In Besamungsstationen werden einerseits Zuchteber unterschiedlicher Herkunft an einem Ort zusammengebracht (Input) und andererseits wird deren Sperma an eine Vielzahl von Empfängerbetrieben verbracht, womit ein hoher Output-Value gegeben ist. Aufgrund dieser Kontaktstrukturen sind Zuchteberpopulationen trotz ihrer geringen Größe epidemiologisch relevant, da bei Gesundheitsproblemen im Zuchteberbestand die Gefahr einer Erregerverschleppung auf die Ferkelerzeugerbetriebe besteht (GUERIN & POZZI, 2005). In Anbetracht der hohen Zahl an Studien, die PCV3 mit Reproduktionsstörungen assoziieren, sollte die Relevanz von Ebersperma als mögliches Vehikel zur Verbreitung von Pathogenen näher beleuchtet werden.

Von anderen gesundheitlich relevanten Viren ist die Ausscheidung im Ebersperma, vor allem während der virämischen Phase bekannt (MAES et al., 2016). Zu diesen gehören auch die Erreger der Maul- und Klauenseuche, der Aujeszky'schen Krankheit und auch die porzinen Parvoviren (GUERIN & POZZI, 2005; MAES et al., 2016). Für PRRSV und CSFV sind Zusammenhänge zwischen Krankheitsausbrüchen in Empfängerbetrieben einerseits und Infektionsgeschehen in Zuchteberstationen andererseits bekannt (ELBER et al., 1999; NATHUES et al., 2016). So kam es 1997 bis 1998 zu einem großen Ausbruch der klassischen Schweinepest in den Niederlanden, während dem auch Besamungsstationen klinische Fälle hatten (ELBER et al., 1999). Im Nachgang der Epidemie konnte im Rahmen von Infektionsversuchen nachgewiesen werden, dass mit CSFV infizierte Eber infektiöses Virus im Sperma ausscheiden und eine Erregerübertragung durch KB möglich ist (DE SMIT et al., 1999). Der PRRS-Ausbruch in der Schweiz 2012 ist ein gutes Beispiel für das Potenzial grenzüberschreitender Erregerübertragung durch Ebersperma, da aus Deutschland importiertes PRRSV haltiges Sperma die Ursache war (NATHUES et al., 2016). Die Ausscheidung von PRRSV im Samen von experimentell infizierten Ebern

wurde bereits 1994 beschrieben (SWENSON et al., 1994; CHRISTOPHER-HENNINGS et al., 1995a). Intermittierende Erregerausscheidung erschwert das Monitoring von PRRSV erheblich (CHRISTOPHER-HENNINGS et al., 1995b).

Darüber hinaus enthalten Eber ejakulate physiologischerweise  $10^4$  bis  $10^5$  Bakterien pro Milliliter (ml), welche größtenteils gramnegativ sind und der Familie Enterobacteriaceae angehören (MAES et al., 2008). Die meisten sind apathogen (MAES et al., 2008), jedoch sind andere bakterielle Erreger wie *Brucella suis* (*B. suis*) (MAES et al., 2008) und *Chlamydia suis* (*C. suis*) (KAUFFOLD et al., 2006), relevante über Sperma übertragbare Pathogene. Im Falle von *C. suis*, ist auch eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber antibiotischen Samenverdünnern gegeben (HAMONIC et al., 2016). In Anbetracht der epidemiologischen Relevanz von Zuchteberpopulationen für andere Pathogene, werden nachfolgend bisherige Kenntnisse bezüglich porciner Circoviren bei Zuchtebern aufgezeigt.

#### **4.2. Porzine Circoviren bei Zuchtebern**

Da PCV1 ein apathogenes Virus ist, gibt es kaum Untersuchungen und Berichte über PCV1 im Ebersperma. 22 von 60 Ebern (jeweils 2 von 30 Betrieben), die in einer koreanischen Studie beprobt wurden, schieden PCV1 im Sperma aus (KIM et al., 2001). Bei Betrachtung der Ejakulatfraktionen der PCV1 positiven Proben, enthielten alle 22 Samenflüssigkeitsfraktionen, neun der Fremdzellfraktionen und in vier Fällen die Spermienkopfreionen virale DNA. Bei 20 dieser 22 Ejakulate konnte gleichzeitig PCV2-DNA nachgewiesen werden (KIM et al., 2001). PCV1 ist verglichen zu PCV2 unter Feldbedingungen wesentlich weniger verbreitet (PUVANENDIRAN et al., 2011) und wird nicht als pathogen gesehen.

Der wirtschaftlichen und gesundheitlichen Bedeutung von PCV2 geschuldet (ALARCON et al., 2013), ist die Anzahl an Studien, die über die Verbreitung dieses Erregers in Zuchteberpopulationen berichten, verglichen zu den anderen porcinen Circoviren, höher. Die erste Beschreibung von PCV2-DNA in Spermaproben tätigte HAMEL et al. (2000) als in zwei von 34 randomisiert untersuchten Proben klinisch

gesunder Tiere Virus-DNA nachgewiesen werden konnte. In einer kanadischen Studie entwickelten experimentell mit PCV2 infizierte Eber eine Virämie (LAROCHELLE et al., 2000). Bezüglich des Nachweises von PCV2-DNA in Sperma, beschrieb die Forschungsgruppe eine intermittierende Ausscheidung (LAROCHELLE et al., 2000). Da keine Virusisolierung aus dem Sperma gelang, fehlte der Nachweis von infektiösem Virus. Außerdem wurde auch PCV2-DNA im Sperma bei gleichzeitiger Abwesenheit einer Virämie nachgewiesen (LAROCHELLE et al., 2000). Im Gegensatz dazu beobachteten MADSON et al. (2008) eine kontinuierliche Ausscheidung von PCV2-DNA im Sperma. Im deutschsprachigen Raum führten SCHMOLL et al. (2008) eine Studie an deutschen und österreichischen Besamungsstationen durch. In 86 von 472 (18,2 %) untersuchten Spermaproben konnte PCV2-DNA nachgewiesen werden. Spermaproben von Zuchtebern die jünger als 16 Monate waren, enthielten signifikant häufiger PCV2-DNA ( $p < 0,05$ ) als ältere Tiere (SCHMOLL et al., 2008). Von 58 Tieren die PCV2-DNA im Sperma enthielten, wurden Serumproben untersucht die allesamt keine PCV2-DNA enthielten (SCHMOLL et al., 2008). Im Gegensatz dazu konnten LANG et al. (2011) bei österreichischen Zuchtebern lediglich in einem von 100 Fällen (1 %) PCV2-DNA im Sperma nachweisen. Eine italienische Forschungsgruppe versuchte mittels In-vitro-Fertilisation PCV2b-positive porzine Blastozysten zu erzeugen (GALEATI et al., 2016). In dieser Studie wurde die Rolle von PCV2 haltigem Sperma bezüglich der Infektion von Blastozysten als irrelevant beschrieben (GALEATI et al., 2016). Für die Erregerübertragung über PCV2 haltiges Ebersperma wird von einer anderen Forschungsgruppe eine Dosisabhängigkeit postuliert (GRASLAND et al., 2013). MADSON und OPRIESSNIG (2011) schätzen die Gefahr einer vertikalen Übertragung von PCV2 durch künstliche Besamung als gering ein und erklären dies mit dem Verdünnungseffekt durch kommerzielle Samenverdünner. Ein erhöhtes Risiko für die Erregerverbreitung, wird für Betriebe mit Natursprung oder Verwendung von betriebseigenem Ebersperma beschrieben (MADSON & OPRIESSNIG, 2011).

FENG et al. (2019) untersuchten in einer retrospektiven Studie

Serumproben von importierten Zuchtebern aus den Vereinigten Staaten, Frankreich und Großbritannien, die zwischen 2011 und 2017 während der Quarantäne genommen wurden, auf PCV3. Von den 2017 gewonnen Serumproben von Ebern die aus den USA importiert wurden, enthielten 11,04 % (33/299) PCV3-DNA. In den Vorjahren konnte ebenfalls PCV3-DNA mit geringerer Häufigkeit nachgewiesen werden (FENG et al., 2019). PCV3 Infektionen scheinen somit auch in Zuchteberstationen in unterschiedlichem Ausmaß aufzutreten. In einer chinesischen Studie wurden in vier von 47 Spermaproben unerklärter Herkunft PCV3-DNA nachgewiesen (KU et al., 2017). Dies ist bis dato der einzige Bericht bezüglich des Nachweises von PCV3-DNA in Ebersperma. KU et al. (2017) vermuten eine Relevanz von Ebersperma für die vertikale Übertragung. Verglichen mit der Vielzahl an Studien die für PCV2 durchgeführt wurden, gibt es eine Vielzahl an offenen Fragen bezüglich der Relevanz von Ebersperma für die Übertragung von PCV3. Daher soll in dieser Studie eine komplette Zuchteberpopulation auf PCV3 untersucht werden, um weitere Kenntnisse bezüglich der epidemiologischen Relevanz von Ebersperma zu erlangen.

## **5. Nachweis von PCV3**

Aufgrund der hohen Nachweisraten von PCV3 Infektionen in mehreren Ländern und dem gehäuften Auftreten von Koinfektionen ist es wichtig schnelle, sensitive und spezifische Methoden des PCV3-DNA Nachweises zur Verfügung zu haben.

Für den Genomnachweis von PCV3 wurden unterschiedliche Methoden etabliert. Neben verschiedenen Polymerasekettenreaktionen (PCR) werden auch recombinase polymerase amplification (RPA) und loop-mediated isothermal amplification (LAMP) verwendet (WANG et al., 2017; PARK et al., 2018; WANG et al., 2019).

Außerdem sind serologische Nachweismethoden mittels enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA) beschrieben (DENG et al., 2018; ZHANG et al., 2019). Für den in situ-Nachweis in Geweben sind die in-situ-Hybridisierung (ISH) und Immunhistochemie beschrieben (PHAN et al., 2016; LI et al., 2018b).

### 5.1. Nachweis von PCV3-DNA mittels PCR

Mithilfe der PCR können PCV3-spezifische Genomfragmente in verschiedenen Probenmaterialien nachgewiesen werden (STADEJEK et al., 2017; FUX et al., 2018). Real-time PCR ist eine sehr effiziente und spezifische Amplifikationsmethode von Genomfragmenten, die gleichzeitig einem geringeren Risiko der Kreuzkontamination ausgesetzt ist (KLEIN, 2002). Ergebnisse der real-time PCR werden in ct-Werten (cycle threshold) angegeben. Der ct-Wert gibt an, im wievielten Amplifikationszyklus während der real-time PCR die Fluoreszenzsignale einen vorher festgelegten Schwellenwert überschreiten (HEID et al., 1996).

In den meisten bisher durchgeführten Studien erfolgt der Nachweis von PCV3-DNA ebenfalls mittels real-time PCR (PALINSKI et al., 2017; FUX et al., 2018; WANG et al., 2019). PALINSKI et al. (2017) nutzten für den Nachweis von PCV3 Genom TaqMan-Sonden. CHEN et al. (2017) entwickelten ein PCR-Verfahren, welches sich den Farbstoff SYBR-Green zu Nutze macht und untersuchten mit diesem 203 Proben von Saugferkeln mit kongenitalem Tremor. Die Nachweisgrenze lag mit  $1,73 \times 10$  Genomkopien pro  $\mu\text{l}$  weit unter jener der konventionellen PCR (CHEN et al., 2017).

Darüber hinaus wurden mehrere Verfahren entwickelt, in denen zusätzlich zu PCV3 noch andere Erreger nachgewiesen werden können. Mittels multiplex PCR-Verfahren gelang LI et al. (2018a) der differenzierte Nachweis von PCV2- und PCV3-DNA. WANG et al. (2019) etablierten ebenfalls eine PCV2/PCV3 multiplex PCR mit einer Amplifikationseffizienz von 92-96 %. Für beide Verfahren konnte eine hohe Spezifität ohne Kreuzreaktionen bestätigt werden (LI et al., 2018b; WANG et al., 2019).

Darüber hinaus gibt es Verfahren die virusfamilienübergreifend sind. So etablierte eine chinesische Forschungsgruppe eine auf dem Farbstoff SYBR-green basierende duplex real-time PCR zum simultanen Nachweis von PCV3 und porcine epidemic diarrhea Virus (PEDV), wobei die Sensitivität für PEDV fast doppelt so hoch war (HAN et al., 2019). Es werden laufend neue bzw. optimierte PCR Methoden entwickelt um die Diagnostik zu verbessern (TIAN et al., 2020; YUAN et al., 2020). Darüber hinaus gibt es einen Bericht über eine multiplex PCR, mittels der alle vier

bekannten porzinen Circoviren erfasst werden können (CHEN et al., 2020).

## **5.2. Genomnachweis von PCV3 mittels isothermaler Amplifikation**

Verglichen mit den PCR-Methoden, ist das LAMP-Verfahren eine sehr einfache, schnell durchführbare, kostengünstige, sensitive und gut sichtbare Alternative (OUYANG et al., 2019). In der Literatur sind mehrere entwickelte LAMP-Verfahren beschrieben (PARK et al., 2018; ZHENG et al., 2018b; KIM et al., 2020).

ZHENG et al. (2018b) entwickelten vier Primer (FIP,BIP,F3,B3) um PCV3-DNA zu amplifizieren. Die Reaktion wird bei einem Volumen von 25 µl, in welchem DNA-Polymerase, ThermoPol-Puffer, DNA-Eluat, Magnesiumsulfat, Betain, Nukleosidtriphosphate (dNTP), die LAMP-Primer und destilliertes Wasser enthalten sind, durchgeführt. Die besten Ergebnisse werden bei 60-minütiger Inkubation bei 60 °C und Beendigung bei 85 °C für fünf Minuten erzielt (ZHENG et al., 2018b). Der Erfolg der Reaktion kann entweder mittels Gelelektrophorese oder mit bloßem Auge nach Beimengung des Farbstoffes SYBR-green unter UV-Licht bewertet werden. ZHENG et al. (2018b) beschreiben das LAMP-Verfahren als mögliche Alternative für die Felddiagnostik, da der Materialaufwand geringer ist und keine hochwertige Labortechnologie nötig ist.

Zur sequenzunabhängigen Anreicherung von zirkulärer DNA wird die rolling-circle amplification (RCA) verwendet (DEMIDOV, 2002). Durch die vom Bakteriophagen phi-29 gewonnene phi-29 DNA-Polymerase, wird die DNA binnen weniger Stunden vervielfacht (JOHNE et al., 2009). Durch die Anreicherung zirkulärer DNA wird der Sequenzierungserfolg erhöht und ist somit ein wichtiger Schritt vor der Sanger-Sequenzierung und wurde zum Beispiel von PALINSKI et al. (2017) zur Anreicherung vor dem Nachweis von PCV3 verwendet.

Der Nachweis von PCV3-DNA mittels real-time RPA wird von WANG et al. (2017) beschrieben. Bei nochmaliger Untersuchung der Proben mittels real-time PCR konnte eine Übereinstimmung von 96,2 % (179/186) zwischen den Resultaten der PCR und der RPA festgestellt werden (WANG et al., 2017).



### 5.3. Indirekter Erregernachweis

Bis jetzt sind noch keine kommerziellen ELISAs für den Nachweis von Antikörpern gegen PCV3 etabliert. Jedoch gibt es in der Literatur Berichte von indirekten ELISA Verfahren (DENG et al., 2018; ZHANG et al., 2019; MORA-DIAZ et al., 2020). Im ersten Fallbericht wurde ein verkürztes Cap-Gen synthetisiert, welches mittels dem Plasmidvektor PET-28a in *Escherichia Coli BL21 (DE3)* Zellen überführt wurde. Die infizierten Zellen exprimierten das "optimierte" Cap-Protein, welches anschließend aufgereinigt wurde und als Antigen für den indirekten ELISA verwendet wurde (DENG et al., 2018). Dem ELISA wurde eine hohe Sensitivität bescheinigt, bei gleichzeitiger Abwesenheit von Kreuzreaktionen mit anderen Pathogenen (PCV1, PCV2, PPV, suides Herpesvirus 1, PRRSV, CSFV) (DENG et al., 2018). In einer weiteren Studie wurde ein vollständiges Cap-Gen synthetisiert und mittels dem Baculovirusexpressionssystem vervielfältigt und als Antigen für den Antikörpernachweis, mit guten Ergebnissen, verwendet (ZHANG et al., 2019). Für ihren Infektionsversuch mit CD/CD Schweinen entwickelten MORA-DIAZ et al. (2020) ebenfalls einen auf einem rekombinanten ORF2 basierenden indirekten ELISA.

### 5.4. Virusisolation von PCV3

Um die Pathogenese und Infektionsdynamik von PCV3 Infektionen zu verstehen, war die erfolgreiche Virusisolation von PCV3 ein ungelöstes Problem (KLAUMANN et al., 2018). PALINSKI et al. (2017) beimpften versuchsweise PK-15 Zellen und porcine Hodenzellen mit PCV3 positiven fetalen Gewebeproben. Die Zelllinien wiesen keinen zytopathischen Effekt auf und die ct-Werte stiegen nach jeder der drei Passagen an, ergo die Viruslast sank (PALINSKI et al., 2017). Eine südkoreanische Forschungsgruppe berichtet von der erfolgreichen Virusisolierung (OH & CHAE, 2020). Dabei wurden primäre Schweinenierenzellen mit dem PCV3 Stamm SNUVR181115 (GenBank accession number MK503331) infiziert. Ein zytopathischer Effekt konnte nicht festgestellt werden, weswegen der PCV3 Nachweis durch ISH erfolgte (OH & CHAE, 2020). Mittels Elektronenmikroskopie konnten intrazytoplasmäre Einschlusskörperchen mit virusähnlichen Partikeln nachgewiesen werden (OH & CHAE, 2020).

Eine weitere Forschungsgruppe berichtete ebenfalls von einer erfolgreichen Virusisolation nach Anreicherung auf PK-15 Zelllinien und konnte darüber hinaus die Replikation dieses Isolats in CD/CD Schweinen nachweisen (MORA-DIAZ et al., 2020).

### **5.5. Befunde histopathologischer Untersuchungen**

Die Anzahl an wissenschaftlichen Arbeiten, in denen histopathologische Untersuchungen von Tieren durchgeführt wurden, welche an einem mit PCV3 assoziierten klinischen Bild litten, ist gering. Die histopathologischen Untersuchungsberichte von PHAN et al. (2016) und (PALINSKI et al., 2017) stammen aus Feldstudien, in denen PCV3 als kausales Pathogen vermutet wird. Daher können diese Beobachtungen lediglich mit PCV3 in Verbindung gebracht und kein kausaler Zusammenhang hergestellt werden.

Im Rahmen der Erstbeschreibung von PCV3 wurden Untersuchungen von Ferkeln, welche an Myokarditis erkrankt waren, durchgeführt (PHAN et al., 2016). Nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten aus dem Herzen wurden folgende Befunde ermittelt: Die Tunica Media und Adventitia der kardialen Arteriole waren mit Lymphozyten und Histiozyten infiltriert, während die Endothelzellen in Teilen hypertroph und hyperplastisch waren (PHAN et al., 2016). Außerdem wurde eine multifokale nichteitrig Myokarditis mit multifokaler Infiltration durch Makrophagen, Plasmazellen und Lymphozyten beschrieben (PHAN et al., 2016). Darüber hinaus wurde mittels ISH, messenger-RNA von PCV3 sowohl in den Entzündungszellen als auch in myokardialen Myozyten und in Leiomyozyten der Tunica Media der Arteriole nachgewiesen. Durch den Nachweis von messenger-RNA wurde gezeigt, dass PCV3 in den infizierten Zellen erfolgreich repliziert (PHAN et al., 2016). In histologischen Schnitten des Kleinhirns fanden PHAN et al. (2016) eine lymphozytäre Infiltration der weißen Substanz.

Die histologische Untersuchung von Schweinenieren aus Tieren mit dem klinischen Bild eines PDNS zeigte eine proliferative Glomerulonephritis, gekennzeichnet durch Sklerosierung der Glomerula und Verdickung der Bowman-Kapsel (PALINSKI et al., 2017). Die Tubuli waren in Teilen

krankhaft erweitert und über das gesamte Interstitium konnten Anhäufungen von Entzündungszellen gefunden werden (PALINSKI et al., 2017). Bei den Tieren mit PDNS ähnlichem klinischen Bild konnten Hautveränderungen festgestellt werden (PALINSKI et al., 2017). Es handelte sich um eine akute nekrotische Dermatitis mit perivaskulären Entzündungen (PALINSKI et al., 2017). In der histologischen Untersuchung der Haut und Unterhaut wurde eine nekrotisierende Vaskulitis einhergehend mit fibrinösen Ausschwitzungen, dem Eindringen neutrophiler Granulozyten und darüber hinaus Hämorrhagien, beobachtet (PALINSKI et al., 2017). Lymphknotenveränderungen resultieren aus einer multifokalen granulomatösen Lymphadenitis mit Anwesenheit mehrkerniger Riesenzellen (PALINSKI et al., 2017). Im Kortex des Lymphknotens konnte eine Lymphozytendepletion bei gelegentlichem Ersatz dieser durch Histiozyten und mehrkernige Riesenzellen festgestellt werden (PALINSKI et al., 2017).

Bei experimentell infizierten CD/CD Schweinen konnte zusätzlich eine lymphoplasmazelluläre Arteritis und Periarteritis der Darmserosa beobachtet werden (MORA-DIAZ et al., 2020).

### **III. MATERIAL UND METHODEN**

#### **1. Ziel der Arbeit**

Im Rahmen dieser Studie wurden Serum- und Nativspermaproben von Zuchtebern einer deutschen Besamungsstation auf PCV3-DNA untersucht. Die Proben wurden von der bestandsbetreuenden Tierärztin der Zuchteberstation im Rahmen eines routinemäßigen Gesundheitsmonitorings im Februar 2020 innerhalb eines Tages gewonnen und für diese Untersuchung zur Verfügung gestellt. Ziel der molekularbiologischen Untersuchung ist es, die Verbreitung von PCV3 Infektionen bei Zuchtebern zu erfassen. Außerdem soll die Relevanz der künstlichen Besamung für die Verbreitung von PCV3 bewertet werden. Folgende Arbeitshypothesen werden überprüft:

1. PCV3-DNA kann aufgrund des ubiquitären Charakters der porcinen Circoviren auch in Serum- und Nativspermaproben von Zuchtebern nachgewiesen werden.
2. Die Nachweishäufigkeit von PCV3 Genom im Sperma korreliert mit dem Alter der untersuchten Tiere.

Zusätzlich soll ermittelt werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Genetik und der Prävalenz von PCV3 Infektionen besteht. Außerdem wird untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen den Eberzuchtbetrieben und dem Infektionsgeschehen in der Eberstation hergestellt werden kann. Auch wenn das Hauptziel dieser Studie der Nachweis von PCV3 Genom ist, wird gleichzeitig mittels multiplex PCR der PCV2-Status erfasst und mit Ergebnissen vorheriger Studien verglichen.

#### **2. Probenentnahme und Lagerung**

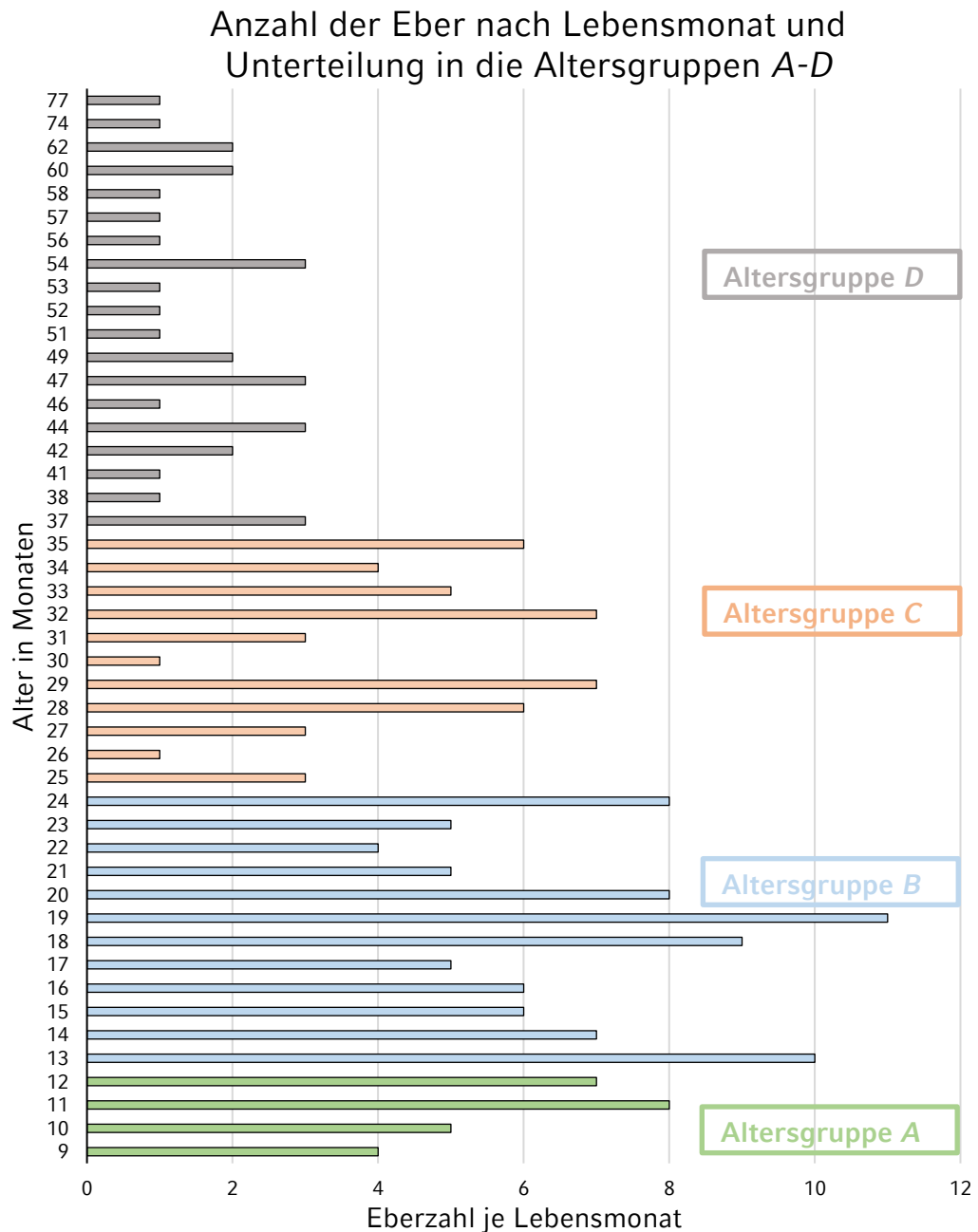
Die Blutprobenentnahme erfolgte nach Fixierung des Oberkiefers mittels einer Oberkieferschlinge aus der Vena jugularis externa. Insgesamt wurden 185 Serum- und 181 Nativspermaproben gewonnen, welche bis zu ihrer Untersuchung an der Klinik für Schweine der LMU München, Sonnenstraße 16, Oberschleißheim, bei -20 °C gelagert wurden.

### 3. Bestands- und Tierinformationen

Die Besamungsstation von der die untersuchten Proben stammen, beliefert 740 Ferkelerzeugerbetriebe in Deutschland regelmäßig mit Ebersperma. Jährlich werden etwa 220.000 Erstbesamungen mit Sperma von dieser Station, bei einer Gesamtverkaufszahl von 450.000 Spermaportionen pro Jahr, durchgeführt. Zusätzlich zur nationalen Vermarktung, wird Ebersperma dieser Besamungsstation international gehandelt.

Neu dazukommende Zuchteber werden vor Ankunft in der Station für mindestens 30 Tage unter Quarantäne gestellt. In dieser Quarantänezeit erfolgt, wie in der Verordnung 90/429/EEG gefordert wird, eine Untersuchung auf relevante Pathogene (*Brucella suis*, CSFV, Pseudorabiesvirus, PRRSV). In der Besamungsstation haben, verteilt auf drei Ställe, bis zu 300 Eber Platz. Der neueste Stall ist so gebaut, dass jedem Tier jeweils 4 m<sup>2</sup> an Mistfläche und 6,5 m<sup>2</sup> an Liegefläche zur Verfügung stehen. Eingestreut wird ausschließlich mit zugekauftem Stroh von Ackerflächen, auf die kein Schweinedung ausgebracht wird. Gefüttert wird ausnahmslos mit Fertigfutter, von dem jede Charge auf Inhaltsstoffe und Mykotoxine untersucht wird. Die Eber werden zweimal täglich per Hand gefüttert um die Tierbeobachtung zu optimieren.

Insgesamt wurden 185 Zuchteber im Rahmen des Gesundheitsmonitoring beprobt und entsprechende Proben in diese Studie eingeschlossen. Von 182 Zuchtebern konnte der Herkunftsbetrieb ermittelt werden. Diese kamen in unterschiedlicher Anzahl (1 – 47) von 26 verschiedenen Herkunftsbetrieben (A - Z), zu denen in Tabelle 1 noch mehr Information gegeben wird. Von allen 185 Tieren war das Alter bekannt. Die Altersspanne reichte von neun bis 77 Monaten. Für die statistische Analyse wurden die Zuchteber in vier Altersgruppen unterteilt: A (bis 12 Monate; 24/185), B (13-24 Monate; 84/185), C (25-36 Monate; 46/185) und D (37 Monate und älter; 31/185). Die Altersstruktur der untersuchten Zuchteberpopulation wird in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3: Anzahl der Eber je Lebensmonat (n = 185). Altersgruppe A (grün; n = 24), B (blau; n = 84), C (orange; n = 46), D (grau; n = 31). Die Altersspanne reicht von 9 bis 77 Monaten.**

Die 185 Zuchteber verteilten sich wie folgt auf die unterschiedlichen Zuchtlinien: *Piétrain*: 151/185 (Pi); *Deutsche Landrasse*: 17/185 (DL); *Deutsches Edelschwein*: 8/185 (DE); *Cerdo Iberico*: 1/185 (Ib); *Duroc*: 6/185 (Du); *Duroc-Piétrain-Kreuzung*: 2/185 (Du x Pi).

**Tabelle 1: Darstellung aller 26 Zuliefererbetriebe (A – Z), der Anzahl jeweils angelieferter Tiere (n = 182) und der Genetik der angelieferten Tiere.**

<b>Betrieb</b>	<b>Anzahl angelieferter Tiere</b>	<b>Genetik der angelieferten Tiere</b>
A	47	45 Pi; 1 DL; 1 DE
B	8	8 DL
C	8	8 Pi
D	9	7 Pi; 2 Du
E	22	22 Pi
F	23	22 Pi; 1 DL
G	1	1 DE
H	6	4 Pi; 1 lb; 1 DL
I	11	11 Pi
J	5	5 Pi
K	1	1 DL
L	1	1 DL
M	7	5 Pi; 1 DE; 1 Du x Pi
N	12	12 Pi
O	1	1 DE
P	1	1 Du x Pi
Q	1	1 Pi
R	2	2 Pi
S	1	1 Pi
T	1	1 Pi
U	4	4 Du
V	3	3 Pi
W	4	4 DE
X	1	1 DL
Y	1	1 DL
Z	1	1 DL

## **4. Labordiagnostische Untersuchungen**

### **4.1. DNA-Extraktion**

Die molekularbiologische Untersuchung zum Genomnachweis von PCV2/PCV3 wurde am Lehrstuhl für Virologie des Instituts für Infektionskrankheiten und Zoonosen der Tierärztlichen Fakultät der LMU München durchgeführt. Sowohl die Sperma- als auch die Serumproben wurden primär als Poolproben (37 Spermapools, 38 Serumpools) aus je fünf Einzelproben untersucht. Bei positiven Ergebnissen einer Poolprobe erfolgte die individuelle Untersuchung der entsprechenden Einzelproben.

#### **4.1.1. DNA-Extraktion aus Serumproben (Serumpools)**

Die Extraktion der viralen DNA aus Serum erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin® 8 Virus Core Kit (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) inklusive der optionalen Proteinase K-Behandlung. Alle Schritte der Extraktion erfolgten dabei nach Vorgaben des Herstellers. Die DNA-Isolierung erfolgte automatisiert mittels Microlab® STARLet (Hamilton Life Science Robotics GmbH, Martinsried, Deutschland). Sowohl das eingesetzte Probenvolumen als auch das zur Elution der aufgereinigten DNA verwendete Puffervolumen betrug 100µl.

#### **4.1.2. DNA-Extraktion aus Spermaproben und Serumeinzelproben**

Die Isolierung viraler DNA aus den Spermaproben erfolgte manuell mit Hilfe des QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben. Hierbei wurde ein Probenvolumen von 200µl und ein Elutionsvolumen von 100µl verwendet.

Da das vorhandene Volumen nicht bei allen Serumproben ausreichte, die Einzelproben automatisiert zu untersuchen, wurde die DNA aller Serumeinzelproben manuell mit dem QIAamp® DNA Mini Kit extrahiert.

### **4.2. Quantitative PCR**

Für den Nachweis von PCV2/PCV3 spezifischen Genomfragmenten wurde ein kommerziell erhältliches qPCR Kit entsprechend den Herstellerangaben verwendet (virotype® PCV2/PCV3, INDICAL BIOSCIENCE GmbH, Leipzig, Deutschland).



Je Reaktionsansatz wurden 5 µl des Eluats, 18 µl virotype® Mix + IC-DNA und 2 µl virotype® PCV2/PCV3 Primers/Probes verwendet und nachfolgend in einem AriaMx Real-Time PCR Gerät (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) untersucht.

Als Kontrollen wurden bei jedem PCR-Lauf eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Die Daten der qPCR wurden mit der AriaMx Software (Version 1.3) ausgewertet.

Die untersuchten Proben wurden anhand der ct-Werte in vier Kategorien unterteilt: Kategorie I (ct <30; hohe Viruslast), Kategorie II (ct: 30 – 34,9; mittlere Viruslast), Kategorie III (ct: 35 – 39,9; niedrige Viruslast), Kategorie IV (ct: 40; negativ).

## **5. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der ermittelten Daten erfolgte mit der Statistiksoftware IBM SPSS® Statistics Version 26.0 (Fa. IBM Corp., Armonk, USA). Die Grafiken wurden mit Microsoft Excel® (Fa. Microsoft, Redmond, USA) erstellt.

Der Kolmogorow-Smirnow-Test wurde durchgeführt um metrische Variablen auf Normalverteilung zu testen. Sofern die Daten normalverteilt waren, wurden die errechneten Mittelwerte mittels t-test oder one-way ANOVA verglichen. Falls die Daten nicht normalverteilt waren, wurden nicht-parametrische Tests durchgeführt (Kruskal-Wallis-Test/Mann-Whitney-U-Test). Im Falle von mehrfachen Gruppenvergleichen wurde das Signifikanzniveau nach Bonferroni korrigiert.

Um quantitative Werte miteinander zu vergleichen, wurden Mittelwerte gebildet. Zusätzlich wurden Minimalwerte, Maximalwerte und die Standardabweichung (SD) des Mittelwertes ermittelt. Als abhängige Variablen in der statistischen Auswertung dienten der Nachweis von PCV3-DNA im Sperma bzw. Serum und die dazugehörigen Erregerlasten (ct-Wert). Die unabhängige Variablen waren das Alter in Monaten (9-77 Monate), die daraus gebildeten Altersgruppen A-D, die Genetik und der Herkunftsbetrieb (A-Z).

Korrelationen wurden mittels Kreuztabellen und dem Chi<sup>2</sup>-Test nach

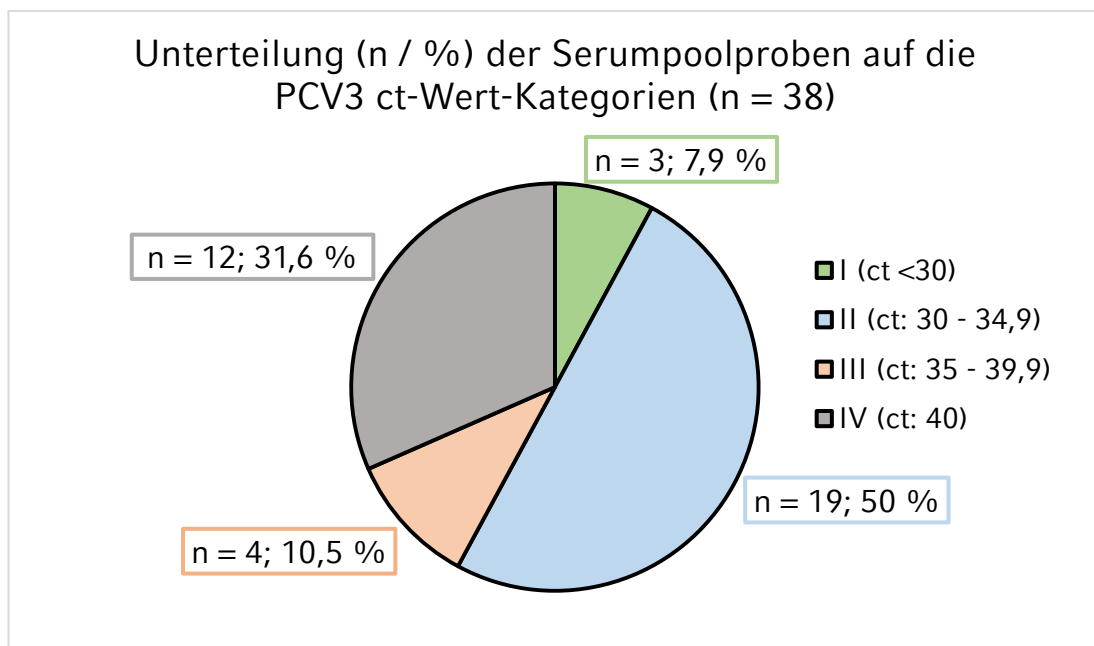
Pearson berechnet. Die Berechnung von Regressionsgleichungen erfolgte durch Lineare Regression. Die Berechnung der Odds Ratio (OR) einschließlich des Konfidenzintervalls erfolgte mit dem Odds Ratio Rechner der Webseite [www.medcalc.org](http://www.medcalc.org). Das Signifikanzniveau dieser Untersuchung lag bei 5 % mit einem Konfidenzintervall (CI) von 95 %.

## IV. ERGEBNISSE

### 1. Molekularbiologische Untersuchungsergebnisse der Serumproben

#### 1.1. Ergebnisse der Serumpools

In 68,4 % (26/38) der untersuchten Serumpools konnte PCV3 Genom nachgewiesen werden. Bei den PCV3-DNA positiven Poolproben lag der niedrigste ct-Wert bei 27,7 und der höchste bei 39,6. In keiner Serumpoolprobe konnte PCV2 Genom nachgewiesen werden. Sämtliche weitere Untersuchungsergebnisse der Serumproben beziehen sich auf den PCV3-DNA Nachweis.



**Abbildung 4: Verteilung der Ergebnisse der Serumpooluntersuchungen (n / %) auf die vier PCV3 ct-Wert-Kategorien (I - IV).**

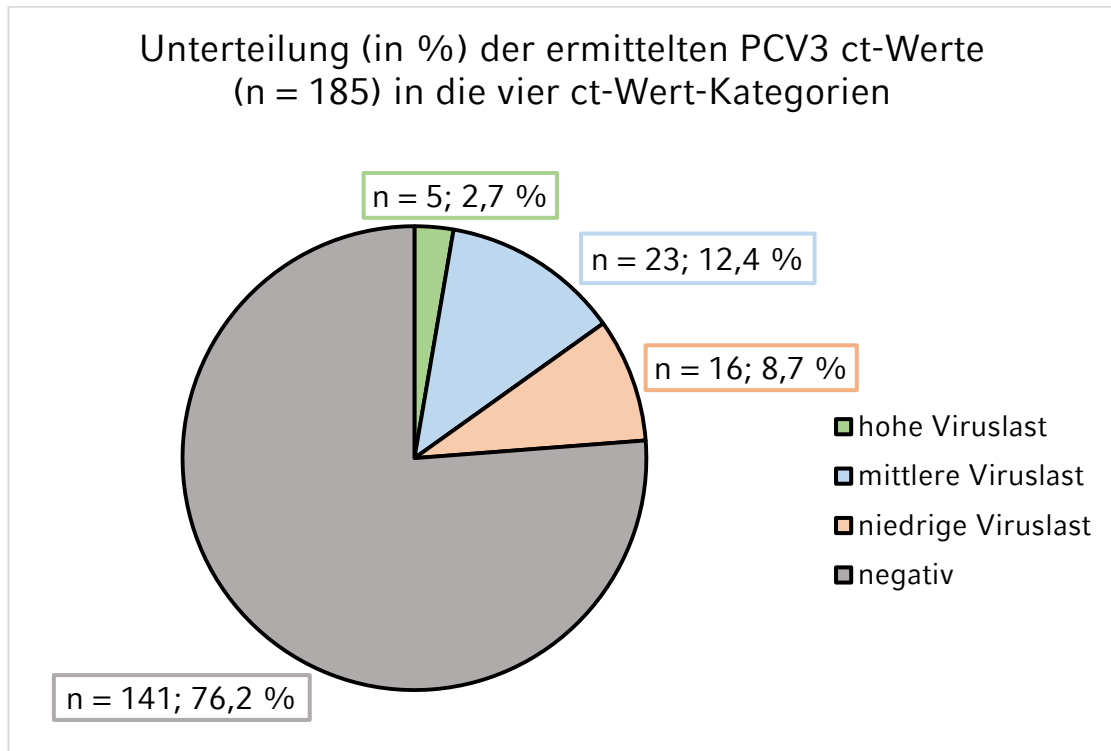
Basierend auf den Ergebnissen der Pooluntersuchung wurden im Anschluss 127 Einzel-PCRs durchgeführt.

#### 1.2. Ergebnisse der Einzel-PCR

23,8 % (44/185; CI: 17,3 – 30,8 %) der untersuchten Serumproben enthielten PCV3-DNA. Das ct-Wert Minimum (Min) lag bei 27,1 (Minimum (Min)) und das Maximum (Max) bei 39,9. Der Mittelwert der ct-Werte der

PCV3-DNA positiven Proben lag bei 34,3 mit einer Standardabweichung von 3,6.

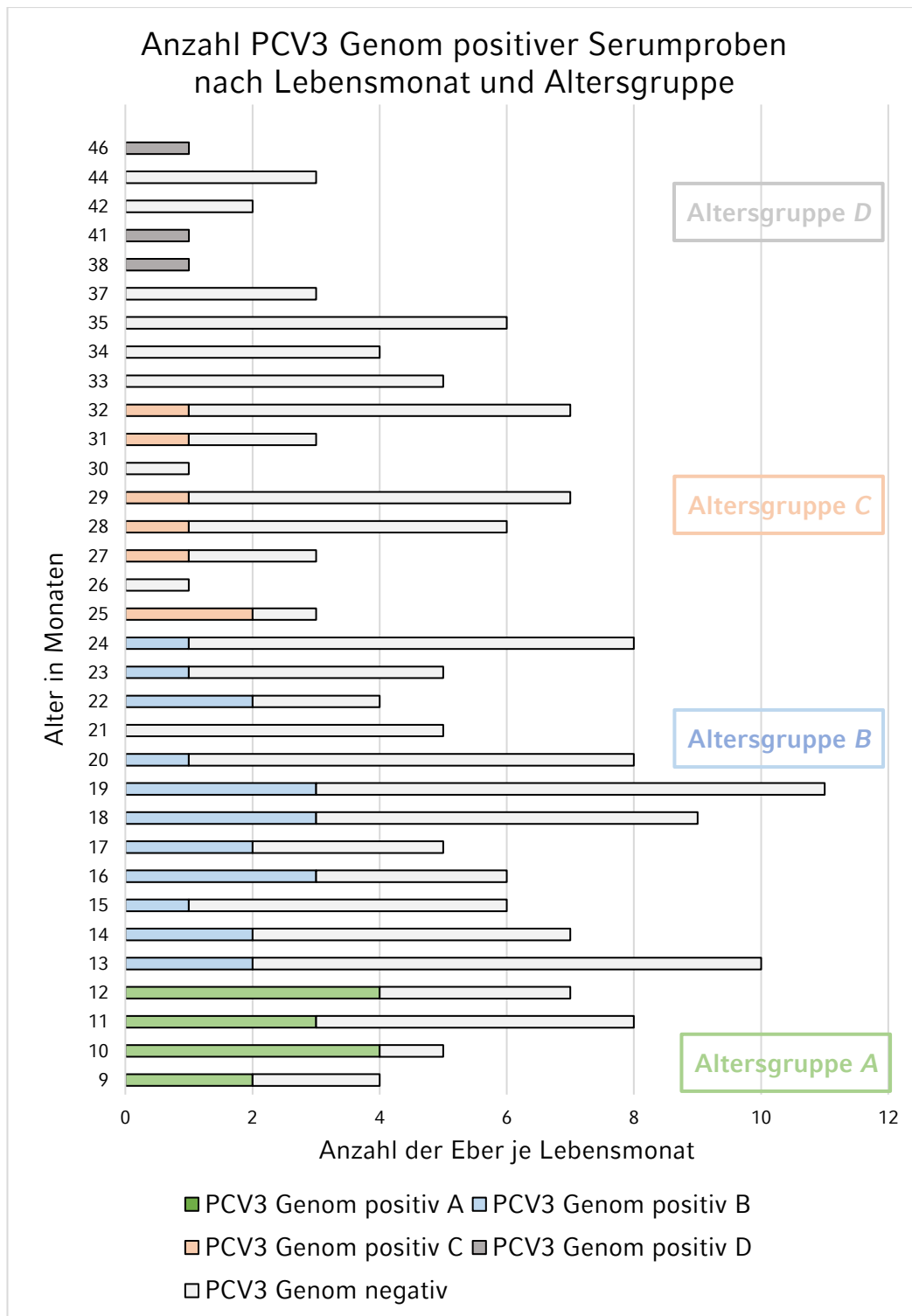
Der Abbildung 5 kann die prozentuale Verteilung der 185 Serumproben auf die vier ct-Wert-Kategorien entnommen werden.



**Abbildung 5:** Darstellung der prozentualen Verteilung der Einzel-PCR Ergebnisse auf die vier PCV3 ct-Wert-Kategorien (I - IV). Kategorie I (grün), Kategorie II (blau), Kategorie III (orange), Kategorie IV (grau).

### 1.2.1. Qualitative Auswertungen der Serumproben

Von allen 185 untersuchten Tieren war das Alter in Monaten zum Zeitpunkt der Probenahme bekannt und wurde in anschließender Auswertung berücksichtigt. PCV3 Genom konnte bei den untersuchten Ebern in einer Altersspanne zwischen 9 Monaten und 46 Monaten nachgewiesen werden. Bei älteren Tieren zwischen 47 und 77 Monaten (n = 20) erfolgte kein Nachweis von PCV3 Genom im Serum.



**Abbildung 6:** Darstellung der Anzahl im Serum PCV3-DNA positiver Tiere (n = 44) und PCV3-DNA negativer Tiere (n = 121) je Lebensmonat. PCV3-DNA positive Tiere der Altersgruppen A (grün), B (blau), C (orange), D (grau) werden in der jeweiligen Farbe dargestellt. PCV3 Genom negative Tiere werden Altersgruppen übergreifend weiß dargestellt. Tiere älter als 47 Monate (n = 20) waren allesamt PCV3 Genom negativ und werden nicht dargestellt.

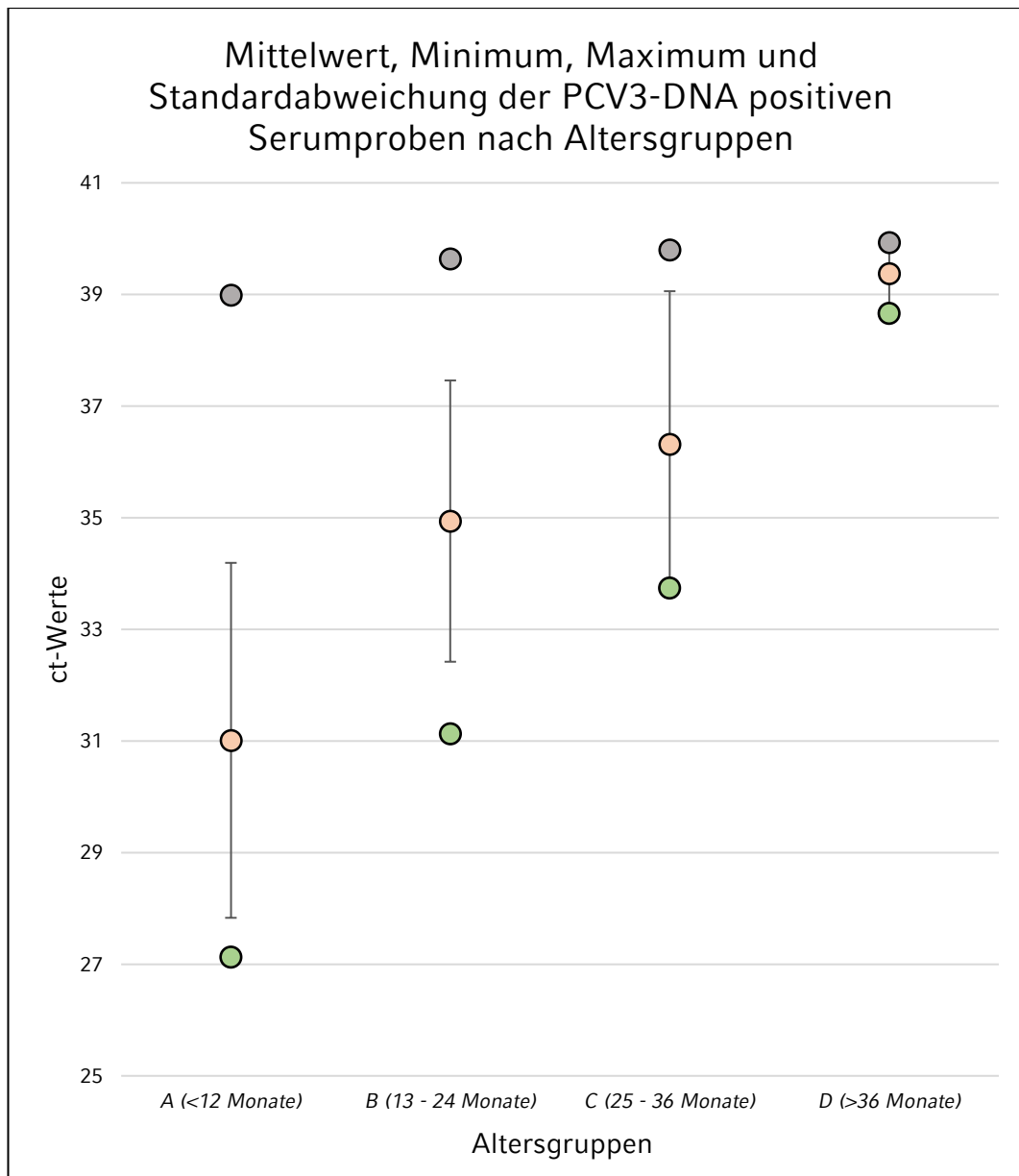
Der Nachweis von PCV3 Genom erfolgte in 54,2 % (13/24; CI: 32,7 – 75,7 %) der Serumproben aus Altersgruppe A. In Altersgruppe A wurde signifikant häufiger PCV3-DNA nachgewiesen als in Serumproben der Altersgruppen B (25,0 %; 21/84; CI: 15,5 – 34,4 %;  $p = 0,008$ ), C (15,2 %; 7/46; CI: 4,4 – 26,0 %;  $p = 0,001$ ) und D (9,7 %, 3/31; CI: -1,3 – 20,7 %;  $p < 0,001$ ).

Die Chance in einer Serumprobe eines Tieres von Gruppe A PCV3-DNA nachzuweisen, ist signifikant höher als in Serumproben von Tieren der Gruppen B (OR: 3,5; CI: 1,4 – 9,1;  $p = 0,009$ ), C (OR: 6,6; CI: 2,1 – 20,5;  $p = 0,001$ ) und D (OR: 11,0; CI: 2,6 – 46,4;  $p = 0,001$ ).

### 1.2.2. Quantitative Auswertungen der Serumproben

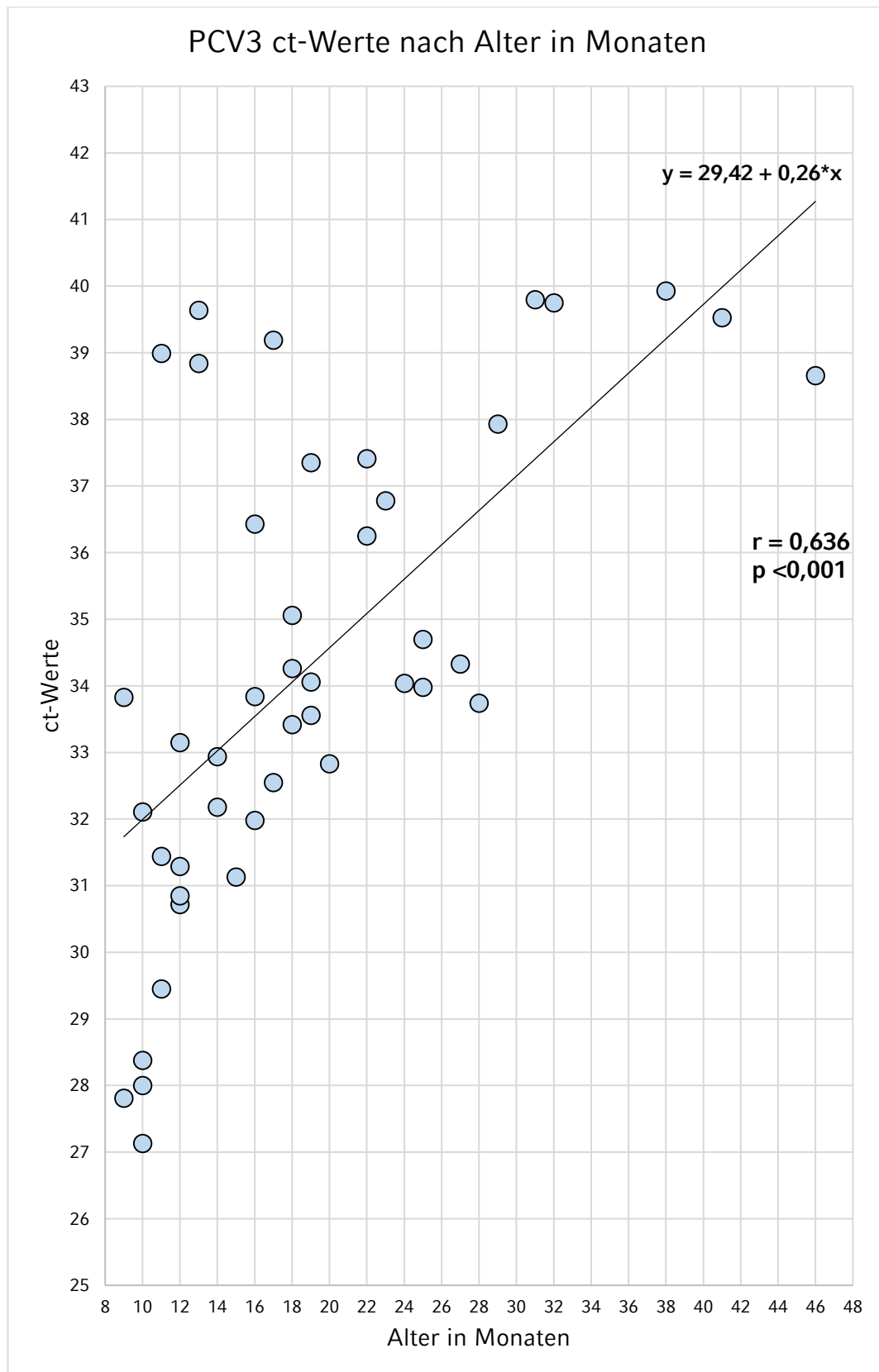
Mittelwerte, Minima und Maxima sowie die Standardabweichung des Mittelwertes der Altersgruppen werden für jede Altersgruppe in Abbildung 7 dargestellt.

Der Mittelwert der ct-Werte der PCV3-DNA positiven Tiere von Altersgruppe A (31,0; CI: 29,1 – 32,9) war signifikant niedriger als der Mittelwert der Gruppen B (34,9; CI: 33,9 – 36,0;  $p = 0,001$ ), C (36,1; CI: 33,8 – 38,9;  $p = 0,001$ ) und D (39,4; CI: 37,8 – 41,0;  $p < 0,001$ ).



**Abbildung 7:** Darstellung der ct-Mittelwerte (orange), Minima (grün), Maxima (grau) und der Standardabweichung des ct-Mittelwertes der PCV3-DNA positiven Serumproben aus den Altersgruppen A - D.

Bei den PCV3-DNA positiven Einzelproben bestand eine signifikante positive Korrelation zwischen der Viruslast im Serum (niedrige ct-Werte) und dem Alter in Monaten ( $r = 0,636$ ;  $p < 0,001$ ). In untenstehender Abbildung 8 werden die ct-Werte sämtlicher PCV3-DNA positiver Serumproben bezogen auf das Alter in Monaten dargestellt.



**Abbildung 8:** Darstellung der ct-Werte der PCV3-DNA positiven Serumproben ( $n = 44$ ) bezogen auf das Alter des Tieres in Monaten (9 - 46 Monate). Zusätzlich die errechnete Regressionsgleichung mit Pearson-Korrelationskoeffizient ( $r = 0,636$ ;  $p < 0,001$ ).



### 1.3. Ergebnisse in Abhängigkeit von der Genetik

In diese Auswertung wurden alle 185 Tiere einbezogen.

*Piétrain*-Eber stellten die größte Gruppe mit 151 von 185 Tieren (81,6 %). In den Serumproben der *Iberico* (n = 1) und *Duroc-Piétrain*-Kreuzungseber (n = 2) konnte kein PCV3 Genom nachgewiesen werden, weswegen diese für die weiteren Auswertungen und Darstellungen ausgeschlossen wurden.

Die höchste numerische Nachweisrate konnte bei den *Edelschwein*-Ebern (37,5 %; 3/8; CI: -6 – 81 %), gefolgt von den *Duroc*-Ebern (33,3 %; 2/6; CI: -28 – 108) ermittelt werden. Bezüglich der Häufigkeit des Nachweises von PCV3 Genom konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

In Tabelle 2 werden die Auswertungen der Genetikgruppen mit mindestens einem PCV3 Genomnachweis im Serum dargestellt.

**Tabelle 2: Darstellung der Anzahl PCV3-DNA positiver Serumproben (n = 44) je Genetik. Darstellung des Anteils PCV3-DNA positiver Serumproben in %, des ct-Mittelwertes der PCV3-DNA positiven Tiere, des Minimums, des Maximums sowie der Standardabweichung des ct-Mittelwertes.**

<b>Genetik</b>				
	<b>Piétrain</b>	<b>Duroc</b>	<b>DL</b>	<b>DE</b>
Anteil der PCV3-DNA positiven Serumproben in % (n)	22,5 % (34/151)	33,3 % (2/6)	29,4 % (5/17)	37,5 % (3/8)
Mittelwert der ct-Werte	34,2	32,6	36,4	36,0
Minimum der ct-Werte	27,1	31,1	32,9	33,8
Maximum der ct-Werte	39,9	34,0	37,9	37,9
Standardab- weichung der ct- Mittelwerte	3,7	2,1	2,9	2,1

## **2. Molekularbiologische Untersuchungsergebnisse der Spermaproben**

### **2.1. Ergebnisse der Spermapoolproben**

Insgesamt wurden 181 Spermaproben in 37 Pools auf PCV2 und PCV3 Genom untersucht. Der Nachweis von PCV2 Genom erfolgte in einem und

der Nachweis von PCV3 Genom in drei Spermapools. Daher wurden vier Spermapools aufgelöst und dementsprechend 20 Spermaproben einzeln untersucht.

**Tabelle 3: Darstellung der Viruslasten der Spermapools mit PCV2- bzw. PCV3-DNA Nachweis. Darüber hinaus werden von allen Tieren, die Teil dieser Pools sind, die Genetik, das Alter in Monaten und die Ergebnisse der Einzel-PCR für Sperma und Serum dargestellt. Tiere die sowohl im Sperma als auch Serum PCV2 bzw. PCV3 Genom positiv waren, werden mit fettem Schriftzug dargestellt.**

Sperma -pool -probe	Eber	Sperma- pool PCV2/3 ct	Sperma- PCR PCV2/3 ct	Serum- PCR PCV3 ct	Alter in Monaten	Genetik
11	17		40	40	35	Pi
	71	PCV3-	40	40	32	Pi
	134	DNA	40	40	51	DE
	136	ct: 32,9	40	40	24	Pi
	<b>151</b>		<b>32,5</b>	<b>28,4</b>	<b>10</b>	<b>Pi</b>
12	19		40	40	12	DL
	25	PCV3-	40	40	33	Pi
	141	DNA	39,9	40	52	Pi
	144	ct: 34,9	40	34,3	27	Pi
	153		40	40	28	Pi
17	15		40	40	32	DL
	<b>30</b>	PCV2-	<b>34,2</b>	<b>29,5</b>	<b>11</b>	<b>Pi</b>
	43	DNA	40	40	14	Pi
	161	ct: 35,1	32,9	40	29	DL
	162		40	32,9	14	DL
36	101		40	33,4	18	Pi
	103	PCV3-	40	40	33	Du
	164	DNA	40	40	34	DL
	179	ct: 39,8	40	38,7	46	DL
	184		35,3	40	23	Pi

## **2.2. Ergebnisse der Einzel-PCR**

Bei der Einzeluntersuchung konnte in drei Proben PCV3 Genom nachgewiesen werden. Somit erfolgte der Nachweis von PCV3-DNA in 1,7 % (3/181; CI: 0 – 3,9 %) der untersuchten Spermaproben.

In 1,1 % (2/181; CI: 0 - 2,8 %) der untersuchten Spermaproben wurde PCV2-DNA nachgewiesen.

## **2.3. Assoziation der Ergebnisse der Spermauntersuchung mit dem Alter, der Genetik und der korrespondierenden Serumprobe**

Für jeweils eine PCV2- bzw. eine PCV3-DNA-haltige Spermaprobe konnte gleichzeitig PCV3 Genom in der korrespondierenden Serumprobe, mit ct-Werten von 29,5 bzw. 28,4, nachgewiesen werden. Die Zuchteber die PCV2- bzw. PCV3-DNA im Sperma ausschieden waren 10, 11, 23, 29 und 52 Monate alt (siehe Tabelle 3).

Somit erfolgte der Nachweis von PCV3-DNA im Sperma sowohl bei Tieren mit als auch ohne PCV3-DNA Nachweis im Serum. Darüber hinaus gab es ein Tier das PCV2-DNA positiv im Sperma und gleichzeitig PCV3-DNA positiv im Serum war. Es konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen der Nachweishäufigkeit oder Virenlast im Sperma einerseits und dem Alter oder der Genetik andererseits hergestellt werden.

## **3. Ergebnisse in Abhängigkeit der Herkunftsbetriebe**

### **3.1. Molekularbiologische Untersuchungsergebnisse der Serumproben in Abhängigkeit der Herkunftsbetriebe**

Von 182 der 185 untersuchten Eber war die Herkunft bekannt. Folglich wurden 182 Zuchteber in diese Auswertung eingeschlossen. 24,2 % (44/182; CI: 18,1 % - 30,8%) dieser Serumproben hatten einen ct-Wert unter 40 und wurden als PCV3-DNA positiv bewertet.

Die PCV3-DNA positiven Tiere kamen von 16 unterschiedlichen Herkunftsbetrieben, folglich war von 61,5 % (16/26) der Herkunftsbetriebe mindestens ein Tier zum Zeitpunkt der Untersuchung PCV3-DNA positiv im Serum.

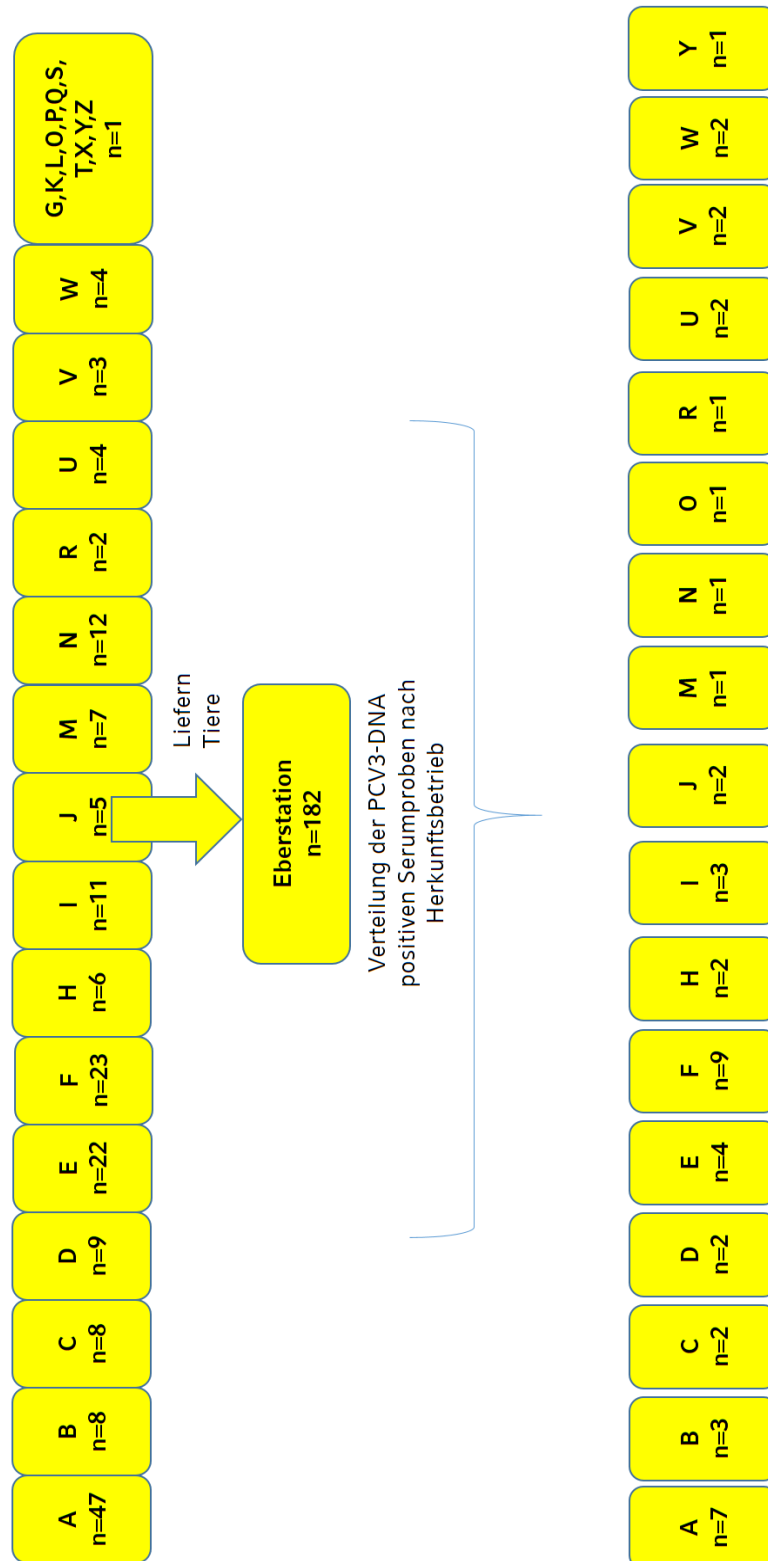


Abbildung 9: Darstellung des Zulaufs der Zuchteberstation. In der oberen Ebene sind die Zuliefererbetriebe (A - Z), mit der Anzahl angelieferter Tiere dargestellt (n = 182). In der unteren Ebene werden die Betriebe mit mindestens einem PCV3 Genomnachweis dargestellt und die dazugehörige Zahl infizierter Tiere.

In Tabelle 4 werden sämtliche Betriebe mit mindestens einem PCV3-DNA positivem Tier dargestellt.

**Tabelle 4: Darstellung der Herkunftsbetriebe (n = 16) mit mindestens einem PCV3-DNA positiven Tier. In der zweiten Spalte werden die Anzahl infizierter Tiere und die PCV3-DNA Nachweisrate für den jeweiligen Betrieb dargestellt. Sofern mehr als eine PCV3-DNA positive Serumprobe vorhanden war, wird der ct-Mittelwert (Minimum/Maximum/Standardabweichung) angegeben.**

<b>Herkunfts- Betrieb</b>	<b>Anteil PCV3-DNA positiv</b>	<b>Mittelwert (Min/Max /SD)</b>
A	14,9 % (7/47)	35,8 (32,2/39,2/2,6)
B	37,5 % (3/8)	36,8 (34,1/39,8/2,9)
C	25 % (2/8)	30,3 (27,8/32,8/3,6)
D	22,2 % (2/9)	28,2 (28,0/28,4/0,3)
E	18,2 % (4/22)	33,7 (30,7/39,6/4,1)
F	39,1 % (9/23)	36,5 (32,9/39,9/2,9)
H	33,3 % (2/6)	34,2 (29,5/39,0/6,8)
I	18,2 % (2/11)	33,9 (33,4/34,3/0,6)
J	40 % (2/5)	33,1 (32,1/34,1/1,3)
M	14,3 % (1/7)	31,2
N	8,3 % (1/12)	32,0
O	100 % (1/1)	36,3
R	50 % (1/2)	27,1
U	50 % (2/4)	32,6 (31,1/34,0/2,1)
V	66,7 % (2/3)	31,7 (30,9/32,6/1,2)
W	50 % (2/4)	35,9 (33,8/37,9/2,9)
Y	100 % (1/1)	38,7

### **3.2. Molekularbiologische Untersuchungsergebnisse der Spermaproben auf Ebene der Herkunftsbetriebe**

Von 179 der 181 (98,9 %) Spermaproben war der Herkunftsbetrieb bekannt. 1,7 % (3/179) dieser Proben wiesen PCV3-DNA ct-Werte unter

40 auf und wurden als positiv gewertet. Die drei positiven Spermaproben gehörten zu Tieren die aus den Herkunftsbetrieben D, I und N stammten.

In 1,1 % (2/179) der untersuchten Spermaproben mit bekannter Herkunft, konnte PCV2-DNA nachgewiesen werden. Diese zwei Proben gehörten zu Tieren aus den Herkunftsbetrieben H und X.

## **V. DISKUSSION**

### **1. Nachweis von PCV3-DNA im Serum**

#### **1.1. Auswertung auf Ebene der Herkunftsbetriebe**

Die untersuchte Population von Besamungsebern setzt sich aus Tieren zusammen, die aus 26 Zuliefererbetrieben in unterschiedlicher Anzahl stammen. Im Rahmen der Untersuchung auf PCV3 Genom konnte in Ebern von 16 (61,5 %) Herkunftsbetrieben in mindestens einer Serumprobe PCV3-DNA nachgewiesen werden. Der hohe Anteil an PCV3-DNA Nachweisen in Bezug auf die Herkunftsbetriebe ist ein mögliches Indiz dafür, dass PCV3 auch in den Herkunftsbetrieben zirkuliert. FUX et al. (2018) wiesen in 75,5 % der untersuchten Mastbestände PCV3 Genom nach. Daraus lässt sich schließen, dass PCV3 in der Hausschweinpopulation in Deutschland weit verbreitet ist, weswegen bereits im Vorfeld der Studie der zusätzliche PCV3 Genomnachweis in Zuchtebern erwartet wurde. Für die Auswertung der Ergebnisse in Bezug auf die Herkunftsbetriebe gilt es zu berücksichtigen, dass die Zuchteber unterschiedlich lange in der Station stehen. Aufgrund der Ergebnisse von FENG et al. (2019), welche Quarantäneproben von importierten Zuchtebern untersuchten und PCV3 Genom nachwiesen, war das Vorkommen von PCV3 in Besamungsebern zu erwarten. Jedoch sollten diese Ergebnisse vorsichtig interpretiert werden, da eine Infektion in der Besamungsstation selber, abhängig von der Verweildauer des untersuchten Tieres, wahrscheinlicher ist. Darüber hinaus befinden sich die Tiere unterschiedlich lange auf der Zuchteberstation und die Anzahl angelieferter Tiere pro Betrieb variiert erheblich. Die Anlieferung von Zuchtebern aus mehreren Herkunftsbetrieben, birgt jedenfalls ein großes Gefahrenpotenzial für die Einschleppung von Pathogenen in den Bestand. Dieses Gefahrenpotenzial für die Einschleppung von PCV3 wird aus der Vielzahl an nationalen und internationalen Studien abgeleitet, in denen die weite Verbreitung nachgewiesen wurde (KWON et al., 2017; STADEJEK et al., 2017; FUX et al., 2018; LIU et al., 2019).



PCV3 wird in verschiedenen Teilen der Welt mit hoher Prävalenz nachgewiesen, weswegen PCV3, genauso wie PCV1 und PCV2, als ubiquitär beschrieben werden kann (OPRIESSNIG et al., 2020). In vorliegender Studie wird zusätzlich erstmals der regelmäßige Nachweis von PCV3 Genom in Serumproben von Zuchtebern beschrieben. Dieses Erkenntnis weist auf eine weite Verbreitung von PCV3 in dieser Produktionsstufe der Schweinehaltung hin und bestärkt den ubiquitären Charakter von PCV3. Es wird davon ausgegangen, dass PCV3 schon längere Zeit vor seiner Erstbeschreibung in den Schweinepopulationen weltweit zirkulierte (COLLINS et al., 2017; OUYANG et al., 2019; SARAIVA et al., 2019). PCV3 gehört als Circovirus zu den unbehüllten DNA-Viren (TISCHER et al., 1982), denen eine sehr hohe Tenazität zugeschrieben wird, womit auch eine Verschleppung über kontaminierte Transportmittel nicht auszuschließen ist. FU et al. (2018) gehen anhand eines statistischen Modells davon aus, dass PCV3 bereits seit 1966 in den Schweinepopulationen zirkuliert. FRANZO et al. (2018b) erwarten ebenfalls eine weltweite Zirkulation und schreiben der starken Verbreitung durch asymptomatische Tiere eine wichtige Rolle zu. Aufgrund der wahrscheinlich längeren Zirkulation von PCV3 in den Schweinepopulationen, kann der Zeitpunkt des PCV3-Eintrags in diese Zuchteberherde nicht bestimmt werden. Außerdem wird vermutet, dass neu hinzukommende junge Eber, teilweise zur verstärkten Erregerzirkulation in der Besamungsstation beitragen und diese aufrechterhalten. Um die Relevanz eines möglichen Erregereintrags durch neu hinzukommende Eber zu bewerten, wären standardmäßige Untersuchungen auf PCV3, während der Quarantäne hilfreich. Dies würde zusätzlich helfen, das Infektionsgeschehen genauer zu lokalisieren (Herkunftsbetriebe oder Zuchteberstation).

## **1.2. Qualitative Auswertung auf Einzeltierebene**

In vorliegender Studie konnte in 23,8 % (44/185) aller untersuchten Serumproben PCV3 Genom mittels PCR nachgewiesen werden. Aufgrund der hohen Sensitivität der PCR, die auch für PCV2 und PCV3 unterscheidende multiplex PCRs beschrieben ist (KIM et al., 2017; LI et al.,

2018a), wird die Zahl falsch negativer Pools in dieser Studie als gering eingeschätzt. Die erste Arbeitshypothese, welche den Nachweis von PCV3 Genom auch in Zuchtebern erwartete, kann als erfüllt angesehen werden, da in dieser Studie der frequente Nachweis auch in Tieren dieser Produktionsstufe erfolgte.

In vorliegender Studie erfolgte der Nachweis von PCV3 Genom in Serumproben auf Einzeltierebene mit 23,8 % häufiger, als in den Untersuchungen von WOZNIAK et al. (2020). In der Studie aus Polen wurde in 9,7 % (141/1451) aller untersuchten Serumproben von drei bis 21 Wochen alten Tieren, die aus 21 bekannt PCV3 positiven Betrieben stammten, PCV3 Genom nachgewiesen (WOZNIAK et al., 2020). Die Betriebe unterschieden sich bezüglich des Gesundheitsstatus, der Produktionsform und des Hygienemanagements (WOZNIAK et al., 2020). Möglicherweise weichen deswegen in jener Studie die Nachweisraten auf den einzelnen Betrieben (1,3 % - 27,4 %) erheblich voneinander ab (WOZNIAK et al., 2020). Somit gibt es in der polnischen Studie sowohl Betriebe mit höheren als auch niedrigeren Nachweisraten verglichen zu der Nachweishäufigkeit von 23,8 % in vorliegender Studie. Sämtliche von WOZNIAK et al. (2020) eingeschlossenen Bestände waren vorher als PCV3 positiv bekannt, weswegen die Nachweisrate von 9,7 % PCV3-DNA positiver Einzelproben als niedrig erscheint. Die Nachweisrate von 23,8 % im Serum PCV3-DNA positiver Tiere in vorliegender Untersuchung weist auf eine weite Verbreitung von PCV3 in der untersuchten Population hin.

In einer in Spanien durchgeführten Follow-Up Untersuchung erfolgte bei fünf- bis sechsfacher Beprobung von zwei bis 25 Wochen alten Tieren, bei 76,3 % (116/152) mindestens einmal der PCV3 Genomnachweis im Serum (KLAUMANN et al., 2019a). Diese Nachweishäufigkeit liegt somit wesentlich höher als die Nachweisrate von 23,8 % PCV3-DNA positiver Serumproben in vorliegender Studie. Die scheinbar wesentlich höhere Nachweisrate relativiert sich bei Betrachtung der Nachweisraten zu den unterschiedlichen Beprobungszeitpunkten, die sich zwischen 6,52 % und maximal 36,37 % bewegten (KLAUMANN et al., 2019a). Somit bewegte sich die Nachweisrate in den eigenen Untersuchungen ebenfalls in dieser Spanne. Die Ergebnisse von KLAUMANN et al. (2019a) zeigen, dass PCV3

in klinisch gesunden Tieren, die in geschlossenen Systemen aufgestellt sind, weit verbreitet zirkuliert. Für den Vergleich der Studienergebnisse von KLAUMANN et al. (2019a) mit der in vorliegender Studie untersuchten Zuchteberpopulation wäre eine Langzeitstudie bei Zuchtebern diagnostisch wertvoll. Zusammenfassend ist die Gesamtnachweisrate von 23,8 % in vorliegender Studie so hoch, dass weitere Forschungsarbeit zur Abklärung der epidemiologischen Relevanz von PCV3 indiziert ist.

Um die Relevanz der Nachweisrate von 23,8 % PCV3-DNA positiver Serumproben auf Einzeltierebene zu bewerten, wurden Bezüge zum Alter und der Genetik der untersuchten Tiere hergestellt. Die Altersspanne der in vorliegender Studie untersuchten Eber lag zwischen neun Monaten und 77 Monaten. Zusätzlich wurden die Tiere für die statistische Analyse in die vier Altersgruppen *A - D* unterteilt. In der vorliegenden Studie konnte in den Serumproben der Tiere aus Gruppe *A* signifikant häufiger PCV3 Genom als bei Tieren der anderen Altersgruppen nachgewiesen werden. Auch die berechnete Odds Ratio zeigt eine signifikant höhere Nachweischance von PCV3 Genom in Serumproben der Altersgruppe *A* verglichen mit den Altersgruppen *B* (OR: 3,5), *C* (OR: 6,6) und *D* (OR: 11,0). Die Ergebnisse vorliegender Untersuchung zeigen also, dass die Nachweishäufigkeit von PCV3 Genom in Tieren jünger als ein Jahr deutlich höher ist.

Ein Erklärungsansatz für den häufigeren Nachweis von PCV3 Genom in jüngeren Tieren, wäre die zeitliche Nähe zum Rückgang der maternalen Immunität. STADEJEK et al. (2017) konnten in Serumproben von Saugferkeln kaum PCV3 Genom nachweisen und assoziieren dies mit einer durch maternale Antikörper vermittelten Immunität. Für PCV2 ist bei Saugferkeln ein durch maternale Antikörper vermittelter Schutz gegen die Infektion mit PCV2 beschrieben (MCKEOWN et al., 2005). MCKEOWN et al. (2005) beobachteten bei höheren Antikörpertitern eine stärkere und längere protektive Wirkung gegen Infektionen mit PCV2. Die höhere Nachweisrate von PCV3-DNA in Zuchtebern, jünger als ein Jahr, könnte analog zu PCV2 im Zusammenhang mit sinkender maternaler Immunität gesehen werden (MCKEOWN et al., 2005). Aufgrund des jungen Alters der Tiere von Gruppe *A* besteht eine zeitliche Nähe zu diesem Zeitraum

höchster Erregerempfindlichkeit. OPRIESSNIG et al. (2004) konnten einen Zusammenhang zwischen der Halbwertszeit maternalen Antikörper einerseits und der Höhe der Antikörpertiter beim Absetzen andererseits feststellen. Je höher die Antikörpertiter waren, desto länger waren die Absetzferkel geschützt (OPRIESSNIG et al., 2004). Unter Feldbedingungen wurde der Zeitraum von der 12. bis zur 16. Lebenswoche als der Zeitraum beschrieben, in dem am häufigsten klinische Fälle von PCVDs beschrieben werden (SHEN et al., 2012). Dies passt zu dem Bericht LAROCHELLE et al. (2003), die für die elfte Lebenswoche das Absinken maternalen Antikörper auf ein Minimum beschreiben. Somit könnte ein kürzer zurückliegendes Infektionsgeschehen ursächlich für die höhere Nachweisrate in Zuchtebern im ersten Lebensjahr (Altersgruppe A) sein. Aufgrund des beobachteten häufigeren PCV3 Genomnachweises sollte auf Tiere dieser Altersgruppe ein besonderes Augenmerk gerichtet werden. Die Beobachtung des häufigeren PCV3 Genomnachweises in jüngeren Tieren, erfolgte analog auch bei Zuchteberuntersuchungen auf PCV2 Genom (REICKS et al., 2007). REICKS et al. (2007) ermittelten in Serum- und Spermaproben von Zuchtebern aus vier Besamungsstationen eine höhere PCV2-Nachweisrate in jüngeren Probanden. Darüber hinaus führte selbige Forschungsgruppe eine Langzeitstudie mit monatlicher Beprobung über fünf Monate hinweg durch (REICKS et al., 2007). Mittels linearer Regression wurde ermittelt, dass die Nachweischance von PCV2 Genom in Serumproben, mit jedem Lebensmonat um 25 % sank ( $OR = 0,75$ ,  $p < 0,001$ ;  $CI: 0,67 - 0,87$ ) (REICKS et al., 2007). Dabei gilt es zu berücksichtigen, dass das Durchschnittsalter bei der ersten Beprobung bei 8,4 Monaten lag (REICKS et al., 2007). Der Abstand zu dem von MCKEOWN et al. (2005) beschriebenen Zeitraum höchster Erregerempfindlichkeit für PCV2 lag somit sehr kurz zurück. Somit kann anhand der Ergebnisse von REICKS et al. (2007) eine sinkende Nachweischance von PCV2 Genom je Lebensmonat angenommen werden, der von diesem Zeitraum aus vergeht. Ob für PCV3 ebenfalls ein derartiger Zusammenhang mit maternaler Immunität besteht und somit ein ähnlicher Infektionsverlauf zutreffend ist, kann anhand der Ergebnisse vorliegender Studie nicht beurteilt werden. Wenn jedoch ein ähnlicher Verlauf für PCV3 zutreffend ist, wäre ein späterer Beginn der Zuchtebernutzung in Betracht

zu ziehen.

Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es nur wenige Studien, die Tiere in weiterführenden Produktionsstufen als der Mast und der Ferkelerzeugung auf PCV3 Genom untersuchten. Eine geeignete Vergleichsstudie ist die Studie von SAPORITI et al. (2020b) in welcher die PCV3-Prävalenz von klinisch gesunden primiparen und multiparen Sauen verglichen wurden. Während bei primiparen Sauen die Nachweisrate bei 33,3 % (19/57) lag, waren sämtliche mittels PCR untersuchten Serumproben der multiparen Sauen (0/64) PCV3-DNA negativ (SAPORITI et al., 2020b). Dies zeigt ebenfalls die Untersuchung, der von diesen Sauen stammenden abortierten Feten (SAPORITI et al., 2020b). Mit einer Nachweisrate von 80,2 %, wurde in Aborten primiparer Sauen, verglichen zu einer Nachweisrate von 7,9 % in Aborten multiparer Sauen, signifikant häufiger PCV3 Genom nachgewiesen (SAPORITI et al., 2020b). Analog zu den Erkenntnissen vorliegender Studie, ist die Häufigkeit des PCV3-DNA Nachweises mit jüngerem Alter assoziiert (SAPORITI et al., 2020b). Somit kann vor allem in jüngeren zur Zucht verwendeten Sauen und Ebern, von einer verstärkten Erregerzirkulation ausgegangen werden.

Eine gegenteilige Beobachtung tätigten sowohl KLAUMANN et al. (2019b) als auch FRANZO et al. (2018a), welche bei einmalig beprobten Wildschweinen von niedrigeren Nachweisraten in juvenilen Tieren (unter 12 Monate) als in adulten Tieren berichteten. Bei mehrfach beprobten Wildschweinen hingegen, konnte über einen längeren Probenzeitraum (bis zu einem Jahr) PCV3 Genom im Serum nachgewiesen werden und dabei erfolgte der Nachweis häufiger in juvenilen Tieren (KLAUMANN et al., 2019b). Die Autoren vermuten, dass PCV3 bei Wildschweinen zu persistenten Infektionen führt (KLAUMANN et al., 2019b). Da die beprobten Tiere subklinisch infiziert waren (KLAUMANN et al., 2019b), wird Wildschweinen eine Rolle als Erregerreservoir für die Hausschweine zugeschrieben.

Bei Betrachtung der Nachweishäufigkeit von PCV3 Genom bezogen auf die unterschiedliche Genetik der Tiere, können keine signifikanten Assoziationen zwischen den unterschiedlichen genetischen Linien beobachtet werden. In einer Studie, welche die Empfänglichkeit für PCV2-

assoziierte Erkrankungen und Läsionen zwischen den Zuchtlinien *Duroc*, *Large White* und *Landrace* verglichen, konnte PCV2 in den *Landrace*-Tieren häufiger und mit höheren Erregerlasten nachgewiesen werden (OPRIESSNIG et al., 2006a). Außerdem konnten bei einem Vergleich von Schweinen der genetischen Linien *Landrace* und *Piétrain*, signifikant schwerwiegendere Lymphknotenläsionen bei ersterer nachgewiesen werden (OPRIESSNIG et al., 2009). Gegensätzlich dazu konnten REICKS et al. (2007) analog zu den Ergebnissen vorliegender Studie, keine signifikante Assoziation für den PCV2 Nachweis in Zuchtebern einer bestimmten Genetik beobachten. Limitierend hinsichtlich der Beurteilung der Relevanz der Zuchtlinien ist in vorliegender Arbeit definitiv der sehr hohe Anteil an *Piétrain*-Ebern ( $n = 151$ ; 81,6 %). Jedoch kann aufgrund des hohen Anteils von Tieren einer Genetik und den Erkenntnissen von OPRIESSNIG et al. (2006a) bezüglich PCV2, eine genetische Prädisposition für PCV3 anhand der Ergebnisse dieser Studie nicht vollends ausgeschlossen werden.

### 1.3. Quantitative Auswertung der Serumproben

60,5 % der untersuchten Serumpools hatten niedrige Viruslasten. Mit 7,9 % (3/38) war der Anteil an Poolproben mit einer hohen Viruslast (ct-Wert kleiner 30) gering. Von den 44 Serumeinzelproben, die PCV3-DNA positiv waren, wiesen 11 % (5/44) hohe Viruslasten mit ct-Werten unter 30 auf. Bei Betrachtung der Viruslasten und dem Alter der untersuchten Tiere, kann eine signifikante Korrelation zwischen der Viruslast und dem Lebensalter in Monaten beobachtet werden ( $r = 0,636$ ). Je jünger die Tiere waren, desto höher war die Viruslast. Die ct-Mittelwerte der PCV3-DNA positiven Serumproben offenbarten ebenfalls eine signifikant höhere Viruslast in Serumproben der Altersgruppe A, verglichen zu den Altersgruppen B, C und D.

Sämtliche Serumproben mit sehr hohen Viruslasten gehörten zu Tieren mit einem Lebensalter unter 12 Monaten. Dies könnte damit erklärt werden, dass diese Tiere, analog zur erhöhten Nachweisrate, erst kürzlich infiziert wurden. Für den kürzer zurückliegenden Infektionszeitpunkt sprechen die Erkenntnisse von SHEN et al. (2012) und auch von MCKEOWN et al. (2005) bezüglich PCV2, die eine höhere Erregerempfindlichkeit mit dem

Absinken maternalen Antikörpertiter assoziieren. Die in dieser Studie ermittelte Korrelation zwischen höheren Viruslasten und dem Alter der Tiere, könnte analog zur erhöhten Nachweisrate erklärt werden. Die höheren Viruslasten können so auf eine noch nicht erfolgte Reduktion der Viruslasten durch das körpereigene Immunsystem zurückgeführt werden. Der von MORA-DIAZ et al. (2020) durchgeführte Infektionsversuch bezüglich PCV3 gibt keinen Aufschluss darüber, wie sich die Erregerlast langfristig entwickelt, da die infizierten Tiere nur über 28 Tage beprobt wurden und bis dahin die Viruslasten anstiegen. Da jedoch die IgM Titer bis Tag 28 ebenfalls anstiegen (MORA-DIAZ et al., 2020), könnte dies auf eine Antwort des Immunsystems hinweisen. Da jedoch in dem 28 Tage andauernden Versuch noch keine Bildung von IgG nachgewiesen wurde, können bezüglich der Entwicklung einer Immunität und der Reduktion der Erregerlasten lediglich Vermutungen angestellt werden (MORA-DIAZ et al., 2020). Exemplarisch konnte für nicht geimpfte Schweine bei Feldinfektionen mit PCV2 ab vier Wochen p.i. ein sukzessiver Abfall der Erregerlast beobachtet werden (LIN et al., 2020). In vorliegender Studie erfolgte der Nachweis hoher Erregerlasten von PCV3 lediglich in Serumproben von Tieren jünger als 12 Monaten. Einhergehend mit der ebenfalls höheren Nachweisrate und erhöhten Nachweischance (OR), sollte ein besonderes Augenmerk auf Zuchteber der Altersgruppe A gerichtet werden.

KLAUMANN et al. (2019b) konnten in Wildschweinproben über einen Zeitraum von mehr als fünf Monaten PCV3 Genom nachweisen und schlugen zwei Infektionsszenarien vor. Einerseits wurde eine persistente Infektion in Betracht gezogen, andererseits eine Reinfektion (KLAUMANN et al., 2019b). Im Falle einer Reinfektion wären die sinkenden Viruslasten mit dem Alter durch die verbesserte Immunantwort durch Antikörper, welche bei vorheriger Infektion gebildet wurden, zu erklären. Um finale Aussagen zu treffen, wäre der PCV3 spezifische serologische Status der untersuchten Eber aufschlussreich. Eine chinesische Forschungsgruppe kam in ihrer Untersuchung zu dem Schluss, dass PCV3 Infektionen meist intermittierend oder einmalig sind und persistente Infektionen nur selten auftreten (ZHAI & XI, 2019). Außerdem schreiben sie PCV3 Infektionen

einen subklinischen Verlauf zu, weswegen die Erregerzirkulation unbemerkt fortschreitet (ZHAI & XI, 2019). Um die Pathogenese und Infektionsverläufe von PCV3 besser zu verstehen, wären Zuchteber aufgrund ihrer zu erwartenden höheren Lebenserwartung geeignete Probanden für Langzeitstudien.

Verschiedene Autoren postulieren für PCV3 ein multifaktorielles Geschehen als Ursache für das Entstehen klinischer Bilder (FRANZO et al., 2018a; KLAUMANN et al., 2018). Für PCV2 ist ebenfalls ein multifaktorielles Geschehen (ROSE et al., 2009) und eine Abhängigkeit von der Virenlast für das Entstehen klinischer Bilder beschrieben (BRUNBORG et al., 2004). ZHAI et al. (2017) und KEDKOVID et al. (2018a) wiesen bei Tieren mit schweren klinischen Zeichen einer respiratorischen Erkrankung signifikant höhere Viruslasten von PCV3 nach als bei nicht erkrankten und vermuten ebenfalls eine Abhängigkeit von der Erregerlast für die Entwicklung einer Klinik. Keiner der untersuchten Zuchteber war zum Zeitpunkt der Beprobung, trotz teils hoher Erregerlasten, klinisch auffällig. Die gegensätzliche Beobachtung verglichen mit ZHAI et al. (2017) und KEDKOVID et al. (2018a) hängt möglicherweise mit der unterschiedlichen Altersstruktur der untersuchten Tiere zusammen. Darüber hinaus können unbelebte Faktoren, wie Stress, Aufstallung, Luftqualität und Fütterung (KLAUMANN et al., 2018) eine Rolle spielen und sich zu den vorherigen Studien unterscheiden. Darüber hinaus ist die Relevanz von PCV3 als kausalem Pathogen immer noch ungeklärt (FRANZO et al., 2018c). Auch wenn die klinische Relevanz für die betroffenen Zuchteber selber auszubleiben scheint, sollte aufgrund der epidemiologischen Relevanz für angeschlossene Ferkelbetriebe der PCV3-Status erfasst und laufend aktualisiert werden.

#### **1.4. Eignung des gewählten Probenmaterials**

WOZNIAK et al. (2020) stellten fest, dass PCV3-DNA in Kotproben (15 %) häufiger nachgewiesen wird als in den korrespondierenden Serumproben derselben Tiere (9,7 %). Mit einer Nachweisrate von 37,3 % (122/327), wird PCV3 anteilmäßig am häufigsten in oral fluids nachgewiesen (WOZNIAK et al., 2020). Bei diesen Ergebnissen gilt es aber zu beachten, dass mittels Kaustrieken wesentlich mehr Tiere beprobt werden und die



Nachweishäufigkeit von PCV3-DNA in oral fluids mitnichten die Einzeltierprävalenz widerspiegelt. Für die Erfassung und Überwachung der PCV3 Prävalenzen in Schweinebeständen wären oral fluids als diagnostische Methode zur Beprobung, ähnlich wie für andere Pathogene beschrieben (RAMIREZ et al., 2012), geeignet. Darüber hinaus wäre diese Art der Probengewinnung sogar durch den Landwirt selber durchführbar. Bei Betrachtung der Anzahl beprobter Tiere und den Zielen dieser Studie, war die Gewinnung von Serum bei gleichzeitiger Erfassung vorhandener bzw. nicht vorhandener Ausscheidung im Sperma, das adäquate Probenmaterial. Da in der polnischen Studie lediglich 30,5 % der PCV3 virämischen Tiere PCV3-DNA positiv im Kot waren (WOZNIAK et al., 2020), wäre eine gleichzeitige Gewinnung von Kotproben im Rahmen dieser Studie wissenschaftlich interessant gewesen, um diese Beobachtungen zu verifizieren.

## **2. Nachweis von PCV2/3-DNA im Sperma**

### **2.1. Qualitative Auswertung der Spermaproben**

In 1,1 % (2/181) bzw. 1,7 % (3/181) aller untersuchten Nativspermaproben konnte PCV2- bzw. PCV3-DNA mittels PCR nachgewiesen werden.

Bezüglich der Nachweishäufigkeit von PCV3-DNA in Spermaproben von Zuchtebern gibt es bisher keine repräsentativen Vergleichsstudien. KU et al. (2017) berichten vom PCV3-DNA Nachweis in 8,5 % (4/47) der untersuchten Spermaproben, womit deren Nachweisrate deutlich höher ist als die 1,7 % in vorliegender Studie. Die Vergleichbarkeit beider Studien ist jedoch kaum gegeben, da keinerlei epidemiologische Hintergründe von Seiten der Autoren angegeben werden. Angaben bezüglich der Betriebe aus denen die Spermaproben stammen oder das Alter der beprobten Tiere, werden nicht gemacht (KU et al., 2017). Es wird lediglich angegeben, dass diese Spermaproben zu einem Probenpool (222 Feten, Gewebe, Sperma und Serum) gehören, welcher sich aus Proben von 35 Betrieben aus 11 Provinzen Chinas zusammensetzt (KU et al., 2017).

Bezüglich des Nachweises von PCV2 Genom im Sperma, liegt die

Nachweisrate in vorliegender Studie (1,1 %) weit unter jener von SCHMOLL et al. (2008), die in 18,2 % aller untersuchten Spermaproben von Zuchtebern PCV2-DNA nachwies. Die wesentlich geringere Nachweisrate von PCV2-DNA in vorliegender Studie, ist auf zwei Einflussfaktoren zurückzuführen. Die Proben von SCHMOLL et al. (2008) stammen aus einer Zeit, in der in Deutschland noch keine Ferkelimpfstoffe gegen PCV2 zugelassen waren. Zusätzlich stammten 90 der 472 untersuchten Spermaproben von Zuchtebern, deren Sperma in Ferkelerzeugerbetrieben gewonnen und verwendet wurde (SCHMOLL et al., 2008). Diese Tiere waren häufiger positiv, als die Zuchteber der Besamungsstationen (SCHMOLL et al., 2008) und tragen zu einer höheren Gesamtnachweisrate in den Spermaproben bei. Dies ergänzt sich mit Erkenntnissen von ROSE et al. (2003), welche die Spermagewinnung im Feldbetrieb als einen der Risikofaktoren für das Auftreten von PMWS in Beständen einstufen. Die Autoren begründen dies unter anderem mit dem Hygieneaspekt der Einzelhaltung in der Besamungsstation, verglichen zu der Aufstallung im Feldbetrieb (ROSE et al., 2003). Zusammenfassend erfolgt der Nachweis von PCV2 Genom in Nativspermaproben von Zuchtebern in vorliegender Untersuchung wesentlich seltener als vor Einführung der PCV2-Ferkelimpfstoffe.

## **2.2. Bezug zu den Ergebnissen der Serumproben**

Von den 44 Tieren, deren Serumproben PCV3-DNA enthielten, schieden jeweils ein Tier PCV2- bzw. PCV3-DNA über Sperma aus. Bei den anderen drei im Sperma PCV2/3 Genom positiven Tieren, erfolgte kein Nachweis im Serum. Es kann keine Korrelation zwischen den Befunden im Serum und dem Sperma hergestellt werden. Zusätzlich war die Viruslast in den Spermaproben verglichen zu den Serumproben niedriger. Eine weitere Beobachtung war, dass die Spermaprobe mit dem niedrigsten PCV3-ct-Wert (32,5) von einem zehn Monate alten Tier mit sehr hoher Virenlast im Serum stammt (ct: 28,4). Möglicherweise bedingt eine hohe Erregerlast im Serum, eine höhere Erregermenge im Sperma, jedoch gilt zu berücksichtigen, dass diese Beobachtung bei lediglich einem Tier getätigt wurde. Für PCV2 konnte in der akuten Phase einer Infektion die simultane Ausscheidung von Erregergenom im Sperma bei gleichzeitiger Virämie

mit hoher Erregerlast in zwei Infektionsversuchen beobachtet werden (LAROCHELLE et al., 2000; MADSON et al., 2008). Analog zu den Ergebnissen der Serumproben, die eine Korrelation hoher Viruslasten mit dem Alter aufzeigen, ist die höchste PCV3 Viruslast in einer Spermaprobe eines Jungebers nachweisbar. Im Gegensatz zu den Untersuchungsergebnissen der Serumproben, können keine Korrelationen bezüglich der Nachweishäufigkeit oder Viruslast und dem Alter hergestellt werden. Somit muss die zweite Arbeitshypothese, welche eine Korrelation der Nachweishäufigkeit von PCV3-DNA im Sperma mit dem Alter vermutete, verworfen werden.

In vorliegender Studie konnte bei Zuchtebern einer deutschen Besamungsstation, in wenigen Fällen eine Ausscheidung von PCV2- bzw. PCV3-DNA im Sperma nachgewiesen werden. Das im Sperma PCV2-DNA positive (ct: 34,2) und im Serum PCV3-DNA positive (ct: 29,5) Tier stammt mit einem Alter von elf Monaten ebenfalls aus der Altersgruppe A. Eine mögliche Erklärung für den gleichzeitigen Nachweis von PCV2 und PCV3 Genom in unterschiedlichem Probenmaterial, wären unterschiedliche Infektionszeitpunkte. In der Literatur gibt es mehrere Arbeiten, die über das gemeinsame Auftreten von PCV2 und PCV3 berichten (PRINZ et al., 2019; SAPORITI et al., 2020a), jedoch ist dies der erste Bericht über die Ausscheidung von PCV2-DNA im Sperma bei einem PCV3 virämischen Tier.

In drei Fällen erfolgte der Nachweis von PCV2- bzw. PCV3-DNA im Sperma, während in den korrespondierenden Serumproben kein PCV3 Genom nachgewiesen wurde. Für PCV2 tätigten SCHMOLL et al. (2008) bei ihrer Untersuchung von Zuchtebern deutscher und österreichischer Besamungsstationen selbige Beobachtung. Von 58 Zuchtebern, deren Spermaproben PCV2-DNA positiv waren, konnte in keiner Serumprobe PCV2-DNA nachgewiesen werden (SCHMOLL et al., 2008). Im Gegensatz dazu konnten MADSON et al. (2008) in einem Infektionsversuch, PCV2 Ausscheidung im Ebersperma, ausschließlich bei vorhandener Virämie beobachten. Eine weitere Erklärung für die Ausscheidung von PCV3-DNA im Ebersperma bei nicht vorliegender Virämie wäre eine persistente Infektion des Reproduktionstraktes mit sporadischer Ausscheidung

geringer Erregerlasten im Sperma, wie es z.B. für *B. suis* beschrieben wird (LORD et al., 1997). So konnte in Ebern, welche als Feten intrauterin mit PCV2 infiziert wurden, bis zur Euthanasie mit 9 Monaten, zwar niemals PCV2-DNA im Serum oder Sperma, aber dafür bei der pathomorphologischen Untersuchung im Reproduktionstrakt nachgewiesen werden (GAVA et al., 2008). Am häufigsten erfolgte dabei der Nachweis in den Bulbourethraldrüsen (7/12) und in den Nebenhoden (4/12) (GAVA et al., 2008). Der PCV2-Antigennachweis im Hoden und den akzessorischen Geschlechtsdrüsen ist für klinisch erkrankte Tiere ebenso beschrieben (OPRIESSNIG et al., 2006b). Selbige Vermutung könnte für PCV3, durch Probengewinnung an Eber verwertenden Schlachthöfen, relativ einfach mit wenig Materialaufwand und kostengünstig überprüft werden (Stichblut und Reproduktionstrakt).

Die Tatsache, dass die Erregerausscheidung über das Sperma und der Status im Serum nicht zusammenhängen, kann für das Monitoring problematisch sein. Ähnliche diagnostische Schwierigkeiten sind auch für das Monitoring von PRRSV bekannt (CHRISTOPHER-HENNINGS et al., 1995b).

### **3. Bewertung der Relevanz von Ebersperma für die Verbreitung von PCV3**

Die Relevanz von Ebersperma für die Weiterverbreitung ist für weitere bedeutsame Pathogene bekannt (ALTHOUSE & ROSSOW, 2011; MAES et al., 2016). So konnte sowohl für die CSF Epidemie in den Niederlanden (DE SMIT et al., 1999; ELBER et al., 1999), als auch für den PRRS-Ausbruch in der Schweiz (NATHUES et al., 2016) ein kausaler Zusammenhang zu Infektionsgeschehen in Besamungsstationen hergestellt werden. In der untersuchten Zuchteberpopulation werden Eber von 26 Herkunftsbetrieben an einem Ort (Zuchteberstation) zusammengeführt und deren Ebersperma an 740 Ferkelerzeugerbetriebe in Deutschland und international verteilt. Damit kann die Besamungsstation als ein zentraler epidemiologischer Parameter für die Schweinehaltung gesehen werden, wie sie von BUTTNER et al. (2015) definiert werden. Bei Gesundheitsproblemen im Zuchteberbestand besteht

die Gefahr einer Erregerverschleppung auf die Ferkelerzeugerbetriebe (GUERIN & POZZI, 2005).

Da PCV3 erst seit 2016 bekannt ist und die Pathogenität dieses Virus noch nicht geklärt ist, gibt es für Besamungsstationen bis dato keinen klaren Leitfaden für den Umgang mit diesem Erreger.

Bezüglich des Ansteckungspotenzials von PCV3-DNA haltigem Ebersperma wurden noch keine Studien durchgeführt. In vorliegender Studie erfolgte in drei untersuchten Nativspermaproben der Nachweis von PCV3 Genom. Die maximale Viruslast im Sperma lag bei einem ct-Wert von 32,5. Insgesamt sind in vorliegender Studie sowohl die Nachweisrate von PCV3-DNA in den untersuchten Spermaproben, als auch die Erregerlasten verglichen mit den Serumproben gering. Um die Gefahr der Erregerverbreitung mittels PCV3-DNA haltigem Sperma, welches für KB verwendet wird, zu bewerten, werden Ergebnisse von Infektionsversuchen mit PCV2 haltigem Ebersperma betrachtet. MADSON et al. (2009c) gelang es mittels direkt vor der künstlichen Besamung mit PCV2 versetztem Ebersperma, Reproduktionsstörungen in den Empfängersauen auszulösen. Auch eine Impfung gegen PCV2 acht Wochen vor der künstlichen Besamung mit dem mit PCV2 versetzten Sperma, konnte eine intrauterine Infektion der Feten nicht verhindern (MADSON et al., 2009b). Im Gegensatz dazu konnte in Feten von Sauen, welche zwölf Wochen vor der KB mit PCV2 infiziert wurden, keine PCV2 Infektion nachgewiesen werden (MADSON et al., 2009b). Dies könnte auf ein geringeres intrauterines Infektionsrisiko für Feten von Sauen mit natürlich erworbener Immunität hinweisen (MADSON et al., 2009b). Im Gegensatz dazu konnten in einem weiteren Infektionsversuch die Beobachtungen der vorhergehenden Untersuchungen nicht bestätigt werden (MADSON et al., 2009a). Zwar war das Sperma von natürlich infizierten Ebern in einem Schweine-Bioassay infektiös (MADSON et al., 2009a). Jedoch konnte nach künstlicher Besamung, weder in den zum Besamungszeitpunkt für PCV2 seronegativen Empfängersauen, noch in deren Feten, PCV2 nachgewiesen werden (MADSON et al., 2009a). MADSON et al. (2009a) erklären ihre Beobachtungen mit einer Dosisabhängigkeit für die intrauterine Infektion und dem Verdünnungseffekt im für die KB verwendeten Sperma. In einer

anderen Studie wurde selbiges Phänomen ebenfalls beobachtet und mit einer Dosisabhängigkeit in Verbindung gebracht (GRASLAND et al., 2013). Zusammenfassend ist PCV2-haltiges Ebersperma potenziell infektiös, jedoch sind die Übertragung und die intrauterine Infektion dosisabhängig.

In vorliegender Untersuchung konnte PCV3-DNA lediglich in drei Nativspermaproben, mit mittleren und niedrigen Viruslasten nachgewiesen werden. Analog zu der für PCV2 postulierten Dosisabhängigkeit für die vertikale Übertragung mittels Ebersperma, wird das Risiko der vertikalen Übertragung von PCV3 mittels KB als gering eingeschätzt. Zwar gilt es für diese Studie den Querschnittscharakter mit einmaliger Beprobung zu berücksichtigen, weswegen lediglich Aussagen bezüglich des Infektionsgeschehens zum Zeitpunkt der Untersuchung getroffen werden können. Jedoch lässt die hohe Anzahl an untersuchten Zuchtebern dennoch Rückschlüsse auf die Relevanz von Ebersperma für die Verbreitung von PCV3 zu. In Anbetracht der geringen Mengen an PCV3-DNA in den wenigen positiven Spermaproben, dem Verdünnungsfaktor für die KB und der bekannten Dosisabhängigkeit für PCV2, ist die Bedeutung von Sperma als Vektor von PCV3 im Rahmen der KB als eher gering zu bewerten.

Um die Relevanz von Ebersperma, welches für die KB verwendet wird, final zu bewerten, bedarf es weiterer Studien und Infektionsversuche, wie sie für PCV2 durchgeführt wurden. Untersuchungen wie sie von KIM et al. (2001) für PCV1 und PCV2 durchgeführt wurden, würden darüber Aufschluss geben, in welchen Spermafraktionen PCV3 zu finden ist. Weiterhin wären Untersuchungen bezüglich der Auswirkungen von Samenverdünnern und der Lagerung auf die Überlebensfähigkeit von PCV3 und die Stärke des Verdünnungseffektes hilfreich.

Solange die Relevanz von PCV3 für die Schweinehaltung nicht abschließend geklärt ist, sollte der PCV3-Status der Zuchteberstationen im Rahmen des routinemäßigen Gesundheitsmonitorings erfasst werden. Somit wäre eine schnelle Handlungsfähigkeit im Falle neuer relevanter Erkenntnisse gegeben. Unter Berücksichtigung der bekannten Assoziationen des häufigeren Erregernachweises und der erhöhten Viruslast mit dem Alter, wird ein späterer Beginn der Spermagewinnung

empfohlen.

Letztendlich erfolgte in vorliegender Studie lediglich der Genomnachweis von PCV3, ob es sich dabei tatsächlich um infektiöses Virus handelt bleibt ungeklärt. Für PCV3 sind bis dato noch keine Isolierungsverfahren etabliert, auch wenn es in der aktuellen Literatur Erfolgsberichte gibt (MORA-DIAZ et al., 2020; OH & CHAE, 2020). Zusätzlich stellt der zytotoxische Effekt des Spermas eine Hürde für die Virusisolierung in Zellkulturen dar (KIM et al., 2001). Für PCV2 sehen MADSON und OPRIESSNIG (2011) eine erhöhte Gefahr der Erregerverbreitung mittels infektiösem Sperma vor allem für solche Betriebe, welche mit Natursprung oder mit betriebseigenem Sperma arbeiten. Die Relevanz von Ebersperma für die Erregerzirkulation von PCV3 könnte für diese Betriebe, analog zu PCV2 (MADSON & OPRIESSNIG, 2011), höher sein.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Untersuchung war es einerseits, die Verbreitung von PCV3 in Serum- und Nativspermaproben von Zuchtebern einer deutschen Besamungsstation zu evaluieren und andererseits, die Relevanz von Ebersperma als potenziellen Vektor für die Erregerverbreitung in der Hausschweinepopulation zu bewerten.

Das Probenmaterial stammt aus einem routinemäßigen Gesundheitsmonitoring und wurde von der bestandsbetreuenden Tierärztin der Besamungsstation für diese Untersuchung zur Verfügung gestellt. Die molekularbiologischen Untersuchungen wurden am Lehrstuhl für Virologie des Instituts für Infektionskrankheiten und Zoonosen der Tierärztlichen Fakultät der LMU München durchgeführt. Insgesamt wurden 185 Serum- und 181 Spermaproben mittels PCR auf PCV2- und PCV3-DNA untersucht. Die Zuchteber stammten in unterschiedlicher Anzahl von 26 Herkunftsbetrieben und standen unterschiedlich lange in der Zuchteberstation. *Piétrain*-Eber (151/185; 81,6 %) waren die mit Abstand am stärksten vertretene Zuchtlinie in der untersuchten Population. Die Altersspanne der Eber von denen das Probenmaterial stammte, reichte von 9 bis 77 Monaten. Für die statistische Analyse wurden die Tiere in die Altersgruppen *A* (<12 Monate), *B* (13 – 24 Monate), *C* (25 – 36 Monate) und *D* (>36 Monate) unterteilt.

In 23,8 % (44/185) aller untersuchten Serumproben wurde PCV3-DNA nachgewiesen. Mittels Kreuztabellen und Chi<sup>2</sup>-Test wurde ermittelt, dass in Serumproben von Altersgruppe *A* signifikant häufiger PCV3-DNA nachgewiesen wird als in den Altersgruppen *B* ( $p = 0.007$ ), *C* ( $p = 0.001$ ) und *D* ( $p < 0.001$ ). Die Chance PCV3-DNA in Serumproben der Altersgruppe *A* zu finden, war 3,5 mal höher als bei Altersgruppe *B*, 6,6 mal höher als bei Gruppe *C* und 11 mal höher als bei Altersgruppe *D*. Die ct-Mittelwerte der PCV3-DNA positiven Serumproben offenbarten eine signifikant höhere Viruslast in Serumproben der Altersgruppe *A*, verglichen zu den Altersgruppen *B*, *C* und *D*. Die Berechnung der Korrelation nach Pearson ergab, dass die Höhe der Viruslasten stark mit einem niedrigen Alter in Monaten korrelierte ( $r = 0,636$ ;  $p < 0,001$ ).



Nur wenige der untersuchten Tiere schieden PCV2- (2/181; 1,1 %) bzw. PCV3-DNA im Sperma aus (3/181; 1,7 %) aus. Ein Zusammenhang zwischen dem PCV3-Status im Serum und korrespondierender Spermaprobe konnte nicht hergestellt werden. So erfolgte sowohl der PCV3-DNA Nachweis im Sperma bei Erregerfreiheit im Serum als auch andersherum. Signifikante Korrelationen bezüglich der Häufigkeit des PCV3-DNA Nachweises im Sperma bzw. der Erregerlast einerseits und dem Alter der Tiere andererseits, konnten nicht hergestellt werden.

In vorliegender Studie erfolgte erstmals der Nachweis von PCV3 Genom in Serumproben bei Zuchtebern einer Besamungsstation, womit der ubiquitäre Charakter von PCV3 bestärkt wird. Es konnte sowohl für die Nachweishäufigkeit von PCV3-DNA im Serum als auch für die Höhe der Viruslasten ein signifikanter Zusammenhang zum Alter der Tiere hergestellt werden. Basierend auf den niedrigen Nachweisraten und Nachweismengen von PCV3 Genom im Sperma und bisherigen Kenntnissen zu PCV2, wird die Relevanz von Ebersperma, welches für die künstliche Besamung verwendet wird, für die Verbreitung von PCV3 als gering eingeschätzt. Eine potenzielle Übertragung von PCV3 durch künstliche Besamung kann nicht restlos ausgeschlossen werden. Daher bedarf es weiterer Forschungsarbeit auf diesem Gebiet.

## VII. SUMMARY

The object of this research was to determine the detection frequency of PCV3 DNA in serum and semen samples of breeding boars from a boar stud in Germany. Furthermore, the relevance of boar semen used for artificial insemination, as a vector for the spread of PCV3 in downstream production was evaluated in this study.

The sample material for this study was collected in the scope of a regularly conducted health monitoring and was provided by the herd attending veterinarian. The laboratory analysis was conducted at the Division of Virology of the Institute for Infectious Disease and Zoonoses, Department of Veterinary Sciences, LMU Munich. 185 serum and 181 semen samples were investigated for PCV2 and PCV3 DNA using a multiplex PCR. The boars originated from 26 boar-multiplier farms in different numbers and have been in the boar stud for a varying period of time. *Piétrain* boars (151/185; 81.6%) were the most represented genetic in the investigated boar herd. The age of the investigated boars ranged between 9 to 77 months. For statistical evaluation the boars were assigned to different age groups *A* (<12 months), *B* (13-24 months), *C* (25-36 months) and *D* (>36 months).

PCV3 DNA was detected in 23.8% (44/185) of the investigated serum samples. Cross-tables and chi-square test revealed a significantly higher detection frequency of PCV3 DNA in serum samples of age group *A* compared to group *B* ( $p = 0.007$ ), *C* ( $p = 0.001$ ) or *D* ( $p < 0.001$ ). The odds for a serum sample from age group *A* to be PCV3 DNA positive, were 3.5, 6.6 and 11 times higher compared to samples from age groups *B*, *C* and *D*, respectively. Mean ct-values of PCV3 DNA positive samples revealed significantly higher viral loads in samples from age group *A*. High viral loads strongly correlated with a young age in months ( $r = 0.636$ ;  $p < 0.001$ ).

Only few investigated animals were shedding PCV2 DNA (2/181; 1.1%) and PCV3 DNA (1.7%; 3/181) in semen. No correlation between PCV3 viremia and occurrence of the virus in corresponding semen samples was present in this study. PCV3 DNA was detected in semen samples of animals

lacking PCV3 viremia as well as the other way round. In contrary to the observations regarding the serum samples, no significant correlations concerning the detection frequency and viral loads on the one hand and the age on the other hand were present for semen.

This is the first study reporting the frequent detection of PCV3 DNA in serum samples from a boar stud and further confirms the ubiquity of PCV3. For the serum samples, PCV3 prevalence and viral loads were significantly associated with the age of the tested boars. The detection frequency and viral loads in the PCV3 DNA positive semen samples were low. Together with the knowledge regarding PCV2, it is concluded that the relevance of semen used for artificial insemination for the spread of PCV3 in downstream production, can be considered low. Since the potential of vertical transmission via artificial insemination cannot be excluded totally, further research regarding this topic is indicated.

## VIII. TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Darstellung aller 26 Zuliefererbetriebe (A – Z), der Anzahl jeweils angelieferter Tiere (n = 182) und der Genetik der angelieferten Tiere. ....</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 2: Darstellung der Anzahl PCV3-DNA positiver Serumproben (n = 44) je Genetik. Darstellung des Anteils PCV3-DNA positiver Serumproben in %, des ct-Mittelwertes der PCV3-DNA positiven Tiere, des Minimums, des Maximums sowie der Standardabweichung des ct-Mittelwertes. ....</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 3: Darstellung der Viruslasten der Spermapools mit PCV2- bzw. PCV3-DNA Nachweis. Darüber hinaus werden von allen Tieren, die Teil dieser Pools sind, die Genetik, das Alter in Monaten und die Ergebnisse der Einzel-PCR für Sperma und Serum dargestellt. Tiere die sowohl im Sperma als auch Serum PCV2 bzw. PCV3 Genom positiv waren, werden mit fettem Schriftzug dargestellt. ....</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 4: Darstellung der Herkunftsbetriebe (n = 16) mit mindestens einem PCV3-DNA positiven Tier. In der zweiten Spalte werden die Anzahl infizierter Tiere und die PCV3-DNA Nachweisrate für den jeweiligen Betrieb dargestellt. Sofern mehr als eine PCV3-DNA positive Serumprobe vorhanden war, wird der ct-Mittelwert (Minimum/Maximum/Standardabweichung) angegeben. ....</i>	<i>41</i>

## IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Darstellung des zirkulären PCV3 Genoms aus FUX et al. (2018), mit den open reading frames 1, 2, 3 und dem alternativen ORF3, welcher erstmals von FACCINI et al. (2017) vorgeschlagen wurde. ....</i>	<i>6</i>
<i>Abbildung 2: Darstellung der vermuteten Erregerzirkulation von PCV3 in Wildtierpopulationen nach OUYANG et al. (2019). ....</i>	<i>11</i>
<i>Abbildung 3: Anzahl der Eber je Lebensmonat (n = 185). Altersgruppe A (grün; n = 24), B (blau; n = 84), C (orange; n = 46), D (grau; n = 31). Die Altersspanne reicht von 9 bis 77 Monaten. ....</i>	<i>25</i>
<i>Abbildung 4: Verteilung der Ergebnisse der Serumpooluntersuchungen (n / %) auf die vier PCV3 ct-Wert-Kategorien (I - IV). ....</i>	<i>30</i>
<i>Abbildung 5: Darstellung der prozentualen Verteilung der Einzel-PCR Ergebnisse auf die vier PCV3 ct-Wert-Kategorien (I - IV). Kategorie I (grün), Kategorie II (blau), Kategorie III (orange), Kategorie IV (grau). .</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 6: Darstellung der Anzahl im Serum PCV3-DNA positiver Tiere (n = 44) und PCV3-DNA negativer Tiere (n = 121) je Lebensmonat. PCV3-DNA positive Tiere der Altersgruppen A (grün), B (blau), C (orange), D (grau) werden in der jeweiligen Farbe dargestellt. PCV3 Genom negative Tiere werden Altersgruppen übergreifend weiß dargestellt. Tiere älter als 47 Monate (n = 20) waren allesamt PCV3 Genom negativ und werden nicht dargestellt. ....</i>	<i>32</i>
<i>Abbildung 7: Darstellung der ct-Mittelwerte (orange), Minima (grün), Maxima (grau) und der Standardabweichung des ct-Mittelwertes der PCV3-DNA positiven Serumproben aus den Altersgruppen A - D. ....</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 8: Darstellung der ct-Werte der PCV3-DNA positiven Serumproben (n = 44) bezogen auf das Alter des Tieres in Monaten (9 - 46 Monate). Zusätzlich die errechnete Regressionsgleichung mit Pearson- Korrelationskoeffizient (<math>r = 0,636</math>; <math>p &lt; 0,001</math>). ....</i>	<i>35</i>
<i>Abbildung 9: Darstellung des Zulaufs der Zuchteberstation. In der oberen Ebene sind die Zuliefererbetriebe (A - Z), mit der Anzahl angelieferter Tiere dargestellt (n = 182). In der unteren Ebene werden die Betriebe mit mindestens einem PCV3 Genomnachweis dargestellt und die dazugehörige Zahl infizierter Tiere. ....</i>	<i>40</i>

## **X. LITERATURVERZEICHNIS**

Alarcon P, et al. Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type-2 subclinical infection in England—An economic disease model. *Prev. Vet. Med.* 2013; 110: 88-102.

Althouse GC, et al. The potential risk of infectious disease dissemination via artificial insemination in swine. *Reprod Domest Anim* 2011; 46 Suppl 2: 64-67.

Bera BC, et al. Detection and genetic characterization of porcine circovirus 3 (PCV3) in pigs in India. *Transbound Emerg Dis* 2020; 67: 1062-1067.

Brunborg IM, et al. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *J Virol Methods* 2004; 122: 171-178.

Buttner K, et al. Characterization of contact structures for the spread of infectious diseases in a pork supply chain in northern Germany by dynamic network analysis of yearly and monthly networks. *Transbound Emerg Dis* 2015; 62: 188-199.

Buttner K, et al. Epidemic Spreading in an Animal Trade Network - Comparison of Distance-Based and Network-Based Control Measures. *Transbound Emerg Dis* 2016; 63: e122-134.

Chang CC, et al. Detection and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 3 in Taiwan. *Arch Virol* 2021; 166: 259-263.

Chen GH, et al. Detection and genome sequencing of porcine circovirus 3 in neonatal pigs with congenital tremors in South China. *Transbound Emerg Dis* 2017; 64: 1650-1654.

Chen N, et al. Development and application of a quadruplex real-time PCR assay for differential detection of porcine circoviruses (PCV1 to PCV4) in Jiangsu province of China from 2016 to 2020. *Transbound Emerg Dis* 2020. DOI: 10.1111/tbed.13833.

Christopher-Hennings J, et al. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. *J Clin Microbiol* 1995a; 33: 1730-1734.

Christopher-Hennings J, et al. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J Vet Diagn Invest* 1995b; 7: 456-464.

Collins PJ, et al. Porcine circovirus type 3 in the UK. *Vet Rec* 2017; 181: 599.

Crowther RA, et al. Comparison of the structures of three circoviruses: chicken anemia virus, porcine circovirus type 2, and beak and feather disease virus. *J Virol* 2003; 77: 13036-13041.

Dal Santo AC, et al. Full-genome sequences of porcine circovirus 3 (PCV3) and high prevalence in mummified fetuses from commercial farms in Brazil. *Microb Pathog* 2020; 141: 104027.

Davies B, et al. Diagnostic phylogenetics reveals a new Porcine circovirus 2 cluster. *Virus Res* 2016; 217: 32-37.

de Smit AJ, et al. Transmission of classical swine fever virus by artificial insemination. *Vet Microbiol* 1999; 67: 239-249.

Dei Giudici S, et al. Genetic Characterization of Porcine Circovirus 3 Strains Circulating in Sardinian Pigs and Wild Boars. *Pathogens* 2020; 9: 344.

Deim Z, et al. Porcine circovirus type 3 detection in a Hungarian pig farm experiencing reproductive failures. *Vet Rec* 2019; 185: 84.

Demidov VV. Rolling-circle amplification in DNA diagnostics: the power of simplicity. *Expert Rev Mol Diagn* 2002; 2: 542-548.

Deng J, et al. Establishment and application of an indirect ELISA for porcine circovirus 3. *Arch Virol* 2018; 163: 479-482.

Dvorak CM, et al. Multiple routes of porcine circovirus type 2 transmission to piglets in the presence of maternal immunity. *Vet Microbiol* 2013; 166: 365-374.

Eddicks M, et al. Low prevalence of porcine circovirus type 2 infections in farrowing sows and corresponding pre-suckling piglets in southern German pig farms. *Vet Microbiol* 2016; 187: 70-74.

Eddicks M, et al. Cross-sectional study on viraemia and shedding of porcine circovirus type 2 in a subclinically infected multiplier sow herd. *Vet Rec* 2019; 184: 189.

Elber AR, et al. The classical swine fever epidemic 1997-1998 in The Netherlands: descriptive epidemiology. *Prev Vet Med* 1999; 42: 157-184.

Ellis J, et al. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J* 1998; 39: 44-51.

Faccini S, et al. Detection and genetic characterization of Porcine circovirus type 3 in Italy. *Transbound Emerg Dis* 2017; 64: 1661-1664.

Feng C, et al. Establishment of a sensitive TaqMan-based real-time PCR assay for porcine circovirus type 3 and its application in retrospective quarantine of imported boars to China. *Vet Med Sci* 2019; 5: 168-175.



Franzo G, et al. Revisiting the taxonomical classification of Porcine Circovirus type 2 (PCV2): still a real challenge. *Virology* 2015; 12: 131.

Franzo G, et al. First report of wild boar susceptibility to Porcine circovirus type 3: High prevalence in the Colli Euganei Regional Park (Italy) in the absence of clinical signs. *Transboundary Emerging Diseases* 2018a; 65: 957-962.

Franzo G, et al. Full-genome sequencing of porcine circovirus 3 field strains from Denmark, Italy and Spain demonstrates a high within-Europe genetic heterogeneity. *Transboundary Emerging Diseases* 2018b; 65: 602-606.

Franzo G, et al. Porcine circovirus type 3: a threat to the pig industry? *Veterinary Record* 2018c; 182: 83.

Franzo G, et al. A wild circulation: High presence of Porcine circovirus 3 in different mammalian wild hosts and ticks. *Transboundary Emerging Diseases* 2019; 66: 1548-1557.

Franzo G, et al. Genotyping porcine circovirus 3 (PCV-3) nowadays: does it make sense? *Viruses* 2020a; 12: 265.

Franzo G, et al. Lack of Porcine circovirus 4 genome detection in pig samples from Italy and Spain. *Pathogens* 2020b; 9: 433.

Fu X, et al. Insights into the epidemic characteristics and evolutionary history of the novel porcine circovirus type 3 in southern China. *Transboundary Emerging Diseases* 2018; 65: e296-e303.

Fux R, et al. Full genome characterization of porcine circovirus type 3 isolates reveals the existence of two distinct groups of virus strains. *Virology* 2018; 15: 25.

Galeati G, et al. Porcine circovirus type 2 detection in in vitro produced

porcine blastocysts after virus sperm exposure. *Anim Sci J* 2016; 87: 511-516.

Gava D, et al. Transmission of porcine circovirus 2 (PCV2) by semen and viral distribution in different piglet tissues. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 2008; 28: 70-76.

Grasland B, et al. Evaluation of the transmission of porcine circovirus type 2 (PCV-2) genogroups a and b with semen from infected specific-pathogen-free boars. *Vet Microbiol* 2013; 162: 381-387.

Guerin B, et al. Viruses in boar semen: detection and clinical as well as epidemiological consequences regarding disease transmission by artificial insemination. *Theriogenology* 2005; 63: 556-572.

Ha Z, et al. Molecular detection and genomic characterization of porcine circovirus 3 in pigs from Northeast China. *BMC Vet Res* 2018; 14: 321.

Hamel AL, et al. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Virol* 1998; 72: 5262-5267.

Hamel AL, et al. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Can J Vet Res* 2000; 64: 44-52.

Hamonic G, et al. Extended semen for artificial insemination in swine as a potential transmission mechanism for infectious *Chlamydia suis*. *Theriogenology* 2016; 86: 949-956.

Han HY, et al. Development of a SYBR green I-based duplex real-time fluorescence quantitative PCR assay for the simultaneous detection of porcine epidemic diarrhea virus and porcine circovirus 3. *Mol Cell Probes* 2019; 44: 44-50.

Hayashi S, et al. First detection of porcine circovirus type 3 in Japan. *J Vet Med Sci* 2018; 80: 1468-1472.

Heid CA, et al. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6: 986-994.

Johne R, et al. Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. *Trends Microbiol* 2009; 17: 205-211.

Karuppannan AK, et al. Attenuation of porcine circovirus 2 in SPF piglets by abrogation of ORF3 function. *Virology* 2009; 383: 338-347.

Kauffold J, et al. Prevalence of chlamydiae in boars and semen used for artificial insemination. *Theriogenology* 2006; 65: 1750-1758.

Kedkovid R, et al. Porcine circovirus type 3 (PCV3) infection in grower pigs from a Thai farm suffering from porcine respiratory disease complex (PRDC). *Vet Microbiol* 2018a; 215: 71-76.

Kedkovid R, et al. Porcine circovirus type 3 (PCV3) shedding in sow colostrum. *Vet Microbiol* 2018b; 220: 12-17.

Kim HR, et al. Multiplex real-time polymerase chain reaction for the differential detection of porcine circovirus 2 and 3. *J Virol Methods* 2017; 250: 11-16.

Kim HR, et al. Advanced target-specific probe-based real-time loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid and specific detection of porcine circovirus 3. *Transbound Emerg Dis* 2020; 67: 2336-2344.

Kim J, et al. Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 2001; 98: 25-31.

Klaumann F, et al. Current Knowledge on Porcine circovirus 3 (PCV-3): A Novel Virus With a Yet Unknown Impact on the Swine Industry. *Front Vet Sci* 2018; 5: 315.

Klaumann F, et al. Infection dynamics of porcine circovirus type 3 in longitudinally sampled pigs from four Spanish farms. *Vet Rec* 2019a; 184: 619.

Klaumann F, et al. Porcine circovirus 3 is highly prevalent in serum and tissues and may persistently infect wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *Transbound Emerg Dis* 2019b; 66: 91-101.

Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med* 2002; 8: 257-260.

Ku X, et al. Identification and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in China. *Transbound Emerg Dis* 2017; 64: 703-708.

Kwon T, et al. Prevalence of novel porcine circovirus 3 in Korean pig populations. *Vet Microbiol* 2017; 207: 178-180.

Lang C, et al. Nachweis des porzinen Circovirus Typ 2 und des Torque-Teno-Sus-Virus 1 und 2 in Samenproben von Ebern einer österreichischen Besamungsstation. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 2011; 39: 201-204.

Larochelle R, et al. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4629-4632.

Larochelle R, et al. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can. J. Vet. Res.* 2003; 67: 114.

Li L, et al. Circovirus in tissues of dogs with vasculitis and hemorrhage. *Emerg Infect Dis* 2013; 19: 534-541.

Li X, et al. A Duplex Real-Time PCR Assay for the Simultaneous Detection of Porcine Circovirus 2 and Circovirus 3. *Virol Sin* 2018a; 33: 181-186.

Li X, et al. Production of a monoclonal antibody against Porcine circovirus type 3 cap protein. *J Virol Methods* 2018b; 261: 10-13.

Li Y, et al. Porcine circovirus 3 in cattle in Shandong province of China: A retrospective study from 2011 to 2018. *Vet Microbiol* 2020; 248: 108824.

Lian H, et al. Novel circovirus from mink, China. *Emerg Infect Dis* 2014; 20: 1548-1550.

Lin C-N, et al. Cross-Sectional Study on the Sero-and Viral Dynamics of Porcine Circovirus Type 2 in the Field. *Vaccines* 2020; 8: 339.

Liu Y, et al. The prevalence of novel porcine circovirus type 3 isolates in pig farms in China. *Transbound Emerg Dis* 2019; 66: 2143-2151.

Lord VR, et al. Serological and bacteriological study of swine brucellosis. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 295-297.

Madson DM, et al. Characterization of shedding patterns of Porcine circovirus types 2a and 2b in experimentally inoculated mature boars. *J Vet Diagn Invest* 2008; 20: 725-734.

Madson DM, et al. Infectivity of porcine circovirus type 2 DNA in semen from experimentally-infected boars. *Vet Res* 2009a; 40: 10.

Madson DM, et al. Effect of natural or vaccine-induced porcine circovirus type 2 (PCV2) immunity on fetal infection after artificial insemination with

PCV2 spiked semen. *Theriogenology* 2009b; 72: 747-754.

Madson DM, et al. Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with porcine circovirus type 2. *Vet Pathol* 2009c; 46: 707-716.

Madson DM, et al. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection on reproduction: disease, vertical transmission, diagnostics and vaccination. *Anim Health Res Rev* 2011; 12: 47-65.

Maes D, et al. Diseases in swine transmitted by artificial insemination: an overview. *Theriogenology* 2008; 70: 1337-1345.

Maes D, et al. Porcine semen as a vector for transmission of viral pathogens. *Theriogenology* 2016; 85: 27-38.

Mankertz A, et al. Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *J Virol* 1997; 71: 2562-2566.

Maurer R. Querschnittsuntersuchung über das Vorkommen von Porzinem Circovirus Typ 2 (PCV2) in erdrückten Saugferkeln aus deutschen Schweinebeständen. Ludwig Maximilians Universität München 2020.

McKeown N, et al. Effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2. *Clin. Vaccine Immunol.* 2005; 12: 1347-1351.

Meehan BM, et al. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *J Gen Virol* 1997; 78:: 221-227.

Meehan BM, et al. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol* 1998; 79:: 2171-2179.

Mora-Diaz J, et al. Isolation of PCV3 from Perinatal and Reproductive Cases of PCV3-Associated Disease and In Vivo Characterization of PCV3 Replication in CD/CD Growing Pigs. *Viruses* 2020; 12: 219.

Nathues C, et al. An Outbreak of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Switzerland Following Import of Boar Semen. *Transbound Emerg Dis* 2016; 63: e251-261.

Oh T, et al. First isolation and genetic characterization of porcine circovirus type 3 using primary porcine kidney cells. *Vet Microbiol* 2020; 241: 108576.

Opriessnig T, et al. Derivation of porcine circovirus type 2-negative pigs from positive breeding herds. *J. Swine Health Prod.* 2004; 12: 186-191.

Opriessnig T, et al. Evidence of breed-dependent differences in susceptibility to porcine circovirus type-2-associated disease and lesions. *Vet. Pathol.* 2006a; 43: 281-293.

Opriessnig T, et al. Demonstration of porcine circovirus type 2 in the testes and accessory sex glands of a boar. *Journal of Swine Health and Production* 2006b; 14: 42-45.

Opriessnig T, et al. Difference in severity of porcine circovirus type two-induced pathological lesions between Landrace and Pietrain pigs. *J Anim Sci* 2009; 87: 1582-1590.

Opriessnig T, et al. Porcine circoviruses: current status, knowledge gaps and challenges. *Virus Res* 2020; 286: 198044.

Ouyang T, et al. Recent progress on porcine circovirus type 3. *Infect Genet Evol* 2019; 73: 227-233.

Palinski R, et al. A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure. *J Virol* 2017; 91: 1-13.

Park YR, et al. Loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid and visual detection of novel porcine circovirus 3. *J Virol Methods* 2018; 253: 26-30.

Patterson AR, et al. Epidemiology and horizontal transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Anim Health Res Rev* 2010; 11: 217-234.

Phan TG, et al. Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. *Virol J* 2016; 13: 184.

Plut J, et al. A molecular survey and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 3 using oral fluid, faeces and serum. *BMC Vet Res* 2020; 16: 281.

Prinz C, et al. Detection of PCV3 in German wild boars. *Virol J* 2019; 16: 25.

Puvanendiran S, et al. Absence of porcine circovirus type 1 (PCV1) and high prevalence of PCV 2 exposure and infection in swine finisher herds. *Virus Res* 2011; 157: 92-98.

Qi S, et al. Molecular detection and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 3 in 21 Provinces of China during 2015-2017. *Transbound Emerg Dis* 2019; 66: 1004-1015.

Ramirez A, et al. Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Prev Vet Med* 2012; 104: 292-300.

Reicks D, et al. (2007) Cross-sectional and longitudinal studies of PCV2



infection in 4 boar studs. Allen D. Leman Swine Conference, 15.09.2007, St.Paul, Minnesota. 104-109.

Rodrigues I, et al. Retrospective study of porcine circovirus 3 (PCV3) in swine tissue from Brazil (1967–2018). *Braz. J. Microbiol.* 2020; 51: 1391-1397.

Rosario K, et al. Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. *Arch Virol* 2017; 162: 1447-1463.

Rose N, et al. Risk factors for porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in 149 French farrow-to-finish herds. *Prev Vet Med* 2003; 61: 209-225.

Rose N, et al. Individual risk factors for Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in pigs: a hierarchical Bayesian survival analysis. *Prev Vet Med* 2009; 90: 168-179.

Rose N, et al. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res* 2012; 164: 78-89.

Saporiti V, et al. Detection and genotyping of Porcine circovirus 2 (PCV-2) and detection of Porcine circovirus 3 (PCV-3) in sera from fattening pigs of different European countries. *Transbound Emerg Dis* 2020a; 67: 2521-2531.

Saporiti V, et al. Frequency of Detection and Phylogenetic Analysis of Porcine circovirus 3 (PCV-3) in Healthy Primiparous and Multiparous Sows and Their Mummified Fetuses and Stillborn. *Pathogens* 2020b; 9: 533.

Saporiti V, et al. Porcine Circovirus 3 Detection in Aborted Fetuses and Stillborn Piglets from Swine Reproductive Failure Cases. *Viruses* 2021; 13:

264.

Saraiva GL, et al. Retrospective detection and genetic characterization of porcine circovirus 3 (PCV3) strains identified between 2006 and 2007 in Brazil. *Viruses* 2019; 11: 201.

Schmoll F, et al. Prevalence of PCV2 in Austrian and German boars and semen used for artificial insemination. *Theriogenology* 2008; 69: 814-821.

Segales J, et al. Porcine circovirus diseases. *Anim Health Res Rev* 2005; 6: 119-142.

Segales J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res* 2012; 164: 10-19.

Serena MS, et al. First detection and genetic characterization of porcine circovirus type 3 (PCV3) in Argentina and its association with reproductive failure. *Transbound Emerg Dis* 2020, DOI: 10.1111/tbed.13893.

Shen H-G, et al. Age-dependent susceptibility to porcine circovirus type 2 infections is likely associated with declining levels of maternal antibodies. *J. Swine Health Prod.* 2012; 20: 17-24.

Shen H, et al. High prevalence of porcine circovirus viremia in newborn piglets in five clinically normal swine breeding herds in North America. *Prev Vet Med* 2010; 97: 228-236.

Stadejek T, et al. First detection of porcine circovirus type 3 on commercial pig farms in Poland. *Transbound Emerg Dis* 2017; 64: 1350-1353.

Sun J, et al. Retrospective study of porcine circovirus 3 infection in China. *Transbound Emerg Dis* 2018; 65: 607-613.

Swenson SL, et al. Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars. J Am Vet Med Assoc 1994; 204: 1943-1948.

Sydler T, et al. Latent porcine circovirus type 2-infected domestic pigs: A potential infection model for the effective development of vaccines against latent or chronic virus induced diseases. Vaccine 2016; 34: 1047-1053.

Temeeyasen G, et al. Pathogenicity and immune response against porcine circovirus type 3 infection in caesarean-derived, colostrum-deprived pigs. J. Gen. Virol. 2021; 102: 001502.

Tian RB, et al. Development of a SYBR green I-based duplex real-time PCR assay for detection of pseudorabies virus and porcine circovirus 3. Mol Cell Probes 2020; 53: 101593.

Tischer I, et al. Characterization of papovavirus-and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. Zentralbl Bakteriol Orig A 1974; 226: 153-167.

Tischer I, et al. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. Nature 1982; 295: 64-66.

Tischer I, et al. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. Arch Virol 1986; 91: 271-276.

Tochetto C, et al. Full-Genome Sequence of Porcine Circovirus type 3 recovered from serum of sows with stillbirths in Brazil. Transbound Emerg Dis 2018; 65: 5-9.

Todd D. Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. Avian Pathol 2000; 29: 373-394.

Vargas-Bermudez DS, et al. First detection of porcine circovirus type 3 in Colombia and the complete genome sequence demonstrates the circulation of PCV3a1 and PCV3a2. *Vet Med Sci* 2019; 5: 182-188.

Wang J, et al. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of porcine circovirus 3. *Mol Cell Probes* 2017; 36: 58-61.

Wang Y, et al. A multiplex real-time PCR assay for the detection and differentiation of the newly emerged porcine circovirus type 3 and continuously evolving type 2 strains in the United States. *J Virol Methods* 2019; 269: 7-12.

Wen S, et al. The detection of porcine circovirus 3 in Guangxi, China. *Transbound Emerg Dis* 2018; 65: 27-31.

Wozniak A, et al. Wide Range of the Prevalence and Viral Loads of Porcine Circovirus Type 3 (PCV3) in Different Clinical Materials from 21 Polish Pig Farms. *Pathogens* 2020; 9: 411.

Ye X, et al. Detection and genetic characterisation of porcine circovirus 3 from pigs in Sweden. *Virus genes* 2018; 54: 466-469.

Yuan L, et al. Optimized real-time fluorescence PCR assay for the detection of porcine Circovirus type 3 (PCV3). *BMC Vet Res* 2020; 16: 249.

Yuzhakov AG, et al. First detection and full genome sequence of porcine circovirus type 3 in Russia. *Virus Genes* 2018; 54: 608-611.

Zhai SL, et al. Comparative epidemiology of porcine circovirus type 3 in pigs with different clinical presentations. *Virol J* 2017; 14: 222.

Zhai SL, et al. Can porcine circovirus type 3 cause persistent infection in pigs? *Vet Rec* 2019; 184: 617-618.

Zhang HH, et al. Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as Porcine circovirus 4, Hunan province, China. *Transbound Emerg Dis* 2020; 67: 1057-1061.

Zhang S, et al. Development and application of a baculovirus-expressed capsid protein-based indirect ELISA for detection of porcine circovirus 3 IgG antibodies. *BMC Vet Res* 2019; 15: 79.

Zheng S, et al. The occurrence of porcine circovirus 3 without clinical infection signs in Shandong Province. *Transbound Emerg Dis* 2017; 64: 1337-1341.

Zheng S, et al. Presence of Torque teno sus virus 1 and 2 in porcine circovirus 3-positive pigs. *Transbound Emerg Dis* 2018a; 65: 327-330.

Zheng S, et al. Rapid specific and visible detection of porcine circovirus type 3 using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Transbound Emerg Dis* 2018b; 65: 597-601.

Zou Y, et al. Molecular detection and sequence analysis of porcine circovirus type 3 in sow sera from farms with prolonged histories of reproductive problems in Hunan, China. *Arch Virol* 2018; 163: 2841-2847.

## **XI. DANKSAGUNG**

Als Erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Mathias Ritzmann dafür bedanken, dass mir die Möglichkeit zu Promotion an der Klinik für Schweine gewährt wurde. Außerdem möchte ich mich für die Zeit an der Schweineklinik bedanken, die trotz pandemiebedingter Ausnahmesituation, eine schöne und lehrreiche Zeit war.

Als Nächstes möchte ich bei meinem Betreuer PD Dr. med. vet. habil. Matthias Eddicks bedanken, welcher mit seinen konstruktiven Vorschlägen und Kritiken das Gelingen dieser Arbeit garantierte. Außerdem möchte ich mich dafür bedanken, dass Herr Eddicks stets ein offenes Ohr für Anliegen bereithielt.

Für die Unterstützung bei der labordiagnostischen Arbeit und der Auswertung selbiger möchte ich mich bei Dr. med. vet. Robert Fux herzlich bedanken. Außerdem möchte ich mich bei den veterinärmedizinischen technischen Assistenten für die Unterstützung bei der Probenbearbeitung bedanken.

Als Nächstes möchte ich mich bei meinen Kollegen und Kolleginnen an beiden Arbeitsplätzen bedanken. Ein großes Dankeschön geht an meine Doktorandenkollegen. Leider war aufgrund der pandemiebedingten Situation, die gemeinsame verbrachte Zeit der Promotion anders als ursprünglich geplant. Bedanken möchte ich mich für die ganzen aufmunternden Worte, wenn es mal nicht so gut lief.

Ein großes Dankeschön geht an meine Eltern, die mir dieses Studium durch ihre tolle Unterstützung ermöglichten. Bei meinen Geschwistern und Freunden möchte ich mich dafür bedanken, dass sie stets ein offenes Ohr für mich hatten. Ein besonderes Dankeschön geht an meine Freundin Ekaterine.